

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Sueli Ferreira da Fonseca

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO CENTRAL NA MODULAÇÃO
DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E TERMORREGULATÓRIAS EM
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Diamantina-MG

2017

Sueli Ferreira da Fonseca

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO CENTRAL NA MODULAÇÃO
DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E TERMORREGULATÓRIAS EM
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda
Coorientador: Prof. Dr. Candido Celso Coimbra

Diamantina – MG

2017

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

F676p Fonseca, Sueli Ferreira da
Participação do sistema colinérgico central na modulação das
respostas cardiovasculares e termorregulatórias em ratos
espontaneamente hipertensos / Sueli Ferreira da Fonseca. –
Diamantina, 2017.
124 p. : il.

Orientador: Ana Cristina Rodrigues Lacerda
Coorientador: Cândido Celso Coimbra

Tese (Doutorado - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas) –Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, 2018.

1. Fisostigmina. 2. Hipertensão. 3. Termorregulação. 4. Pressão
arterial. 5. Exercício. I. Lacerda, Ana Cristina Rodrigues. II. Coimbra,
Cândido Celso. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 616.1

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SUELI FERREIRA DA FONSECA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO CENTRAL NA MODULAÇÃO
DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E TERMORREGULATÓRIAS EM
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.**

Tese apresentada ao PROGRAMA
MULTICÊNTRICO DE PÓS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - STRICTO SENSU,
nível de DOUTORADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOCTOR SCIENTIAE EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

Orientador : Prof.^a Dr.^a Ana Cristina
Rodrigues Lacerda

Data da aprovação : 15/12/2017



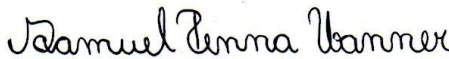
Prof.^a Dr.^a ANA CRISTINA RODRIGUES LACERDA - UFVJM



Prof.Dr. MARCO FABRÍCIO DIAS PEIXOTO - UFVJM



Prof.^a Dr.^a DANUSA DIAS SOARES - UFMG



Prof.Dr. SAMUEL PENNA WANNER - UFMG



Prof.Dr. DANIEL CAMPOS VILLELA - UFVJM

DIAMANTINA

Dedico esta tese a todos que contribuíram para a sua realização, em especial à minha mãe Deija e ao meu amor Thiago, que com imenso carinho, amor e apoio formaram o alicerce para que eu concretizasse este sonho.

AGRADECIMENTOS

Durante esse longo percurso da pós-graduação contei com o apoio, incentivo e ajuda de muitas pessoas que me ajudaram a superar dificuldades e vencer desafios. Pessoas que foram inspiração, ensinamento, amparo, proteção, contribuição, alegria, energia positiva... Enfim, tenho consciência que sozinha nada disso teria sido possível, por isso o sentimento que define esta conquista é gratidão.

"Somos anjos de uma asa só, e podemos voar somente estando abraçados."

(Luciano de Crescenzo).

Início meus agradecimentos a minha amada mãe, que me ensinou a ter fé e saber esperar a vontade de Deus com paciência e amor, agradecendo a dádiva da vida todos os dias. Sorriu comigo nos momentos de alegria e me confortou nos momentos de tristeza, fazendo acreditar que tudo daria certo.

Meu agradecimento mais especial ao meu lindo: Thiago. Sempre ao meu lado todo o tempo, segurando a minha mão e enfrentando junto comigo todos os desafios. Passamos por tantos momentos juntos, vencemos tantas dificuldades que não foram poucas nestes últimos anos, que nos mostrou que nosso amor é forte e verdadeiro. Agradeço cada sorriso, cada gesto de carinho, de cuidado, de apoio e de compreensão. Sem você, eu não teria forças para chegar até aqui. Amo você!

Agradeço toda minha família, meu porto seguro! Cada um teve um papel muito especial nesta conquista. Em especial, agradeço minha irmã amiga Sirley pelo carinho e apoio. Obrigada por se fazer tão presente em minha vida, especialmente por compreender as minhas faltas e momentos de ausência. Ao meu irmão Tininho e sua esposa Leila que me acolheram em seu lar com tanto carinho e amor quando cheguei tão nova e cheia de sonhos à Diamantina. Vocês três sempre me apoiaram e incentivaram para que eu fosse à busca dos meus sonhos. Vocês foram meus maiores incentivadores e determinantes para a escolha deste “futuro presente”. Recebam minha eterna gratidão!

À minha orientadora Prof.^a Ana Cristina Lacerda, pela orientação sensível e compromissada. Não tenho palavras para agradecê-la pelo carinho, amizade, paciência e ensinamentos que levarei comigo sempre. Agradeço por toda a confiança depositada em mim durante esses 10 anos de convivência e por todas as oportunidades que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal.

Às minhas queridas e competentes companheiras e amigas de laboratório Sara Barros e Talita Domingues, pela disponibilidade e compromisso durante todo o período de coleta de

dados que adentraram finais de semana e feriados. O que teria sido de mim sem vocês? Com certeza eu não estaria escrevendo esta tese hoje se não fosse à ajuda competente e compromissada de vocês. Recebam meu carinho e gratidão!

Ao querido amigo Dirceu Melo, pela paciência e disposição no compartilhamento de conhecimentos sobre experimentação animal e técnicas utilizadas neste trabalho. Agradeço-o também por todo auxílio no enfrentamento das adversidades encontradas durante a coleta de dados. Você é demais Di!

Aos amigos da pós-graduação, em especial a Jeanne Martins e Liliane Costa que tornaram os meus dias no laboratório mais alegres, divertidos e leves. Em meio à tensão das coletas, era impossível não sorrir tendo-as por perto. E quando chegavam exatamente no momento de me salvar da eutanásia dos animais? Aí a alegria era ainda mais certa! Obrigada por tudo meninas!

Agradeço também à Jousielle Santos pelas longas e agradáveis conversas de quinta-feira à tarde. À Vanessa Ribeiro pela amizade sincera. À Lauane Moreno, Rosalina Tossige e Camila Neves pela amizade e apoio durante esta jornada.

Ao Professor Dr. Washington Pires agradeço imensamente pela disponibilidade e paciência com que me ensinou as cirurgias de canulação arterial e canulação intracerebroventricular, bem como pela valiosa contribuição e auxílio durante todo desenvolvimento deste trabalho.

A professora Dr.^a Laura Leite pela parceria de sempre. Agradeço pela disponibilidade e rigor na leitura dos artigos que compõem esta tese que contribuíram para sua melhoria.

Aos Professores Dr.^a Danusa Dias Soares, Dr. Samuel Wanner, Dr. Marco Fabrício Peixoto e Dr. Daniel Villela pela disponibilidade para compor a banca examinadora e generosa contribuição ao trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFIEX) e Laboratório de Inflamação e Metabolismo (LIM) pelo compartilhamento de experiências e conhecimento. Em especial a Professora Dr.^a Vanessa Amaral, pela pessoa doce e amável que és.

Aos Professores Dr. Wagner Pereira, Dr.^a Cynthia Fernandes, Dr.^a Elizabeth Esteves e Dr. Fabiano Amorim agradeço pela confiança ao permitirem o empréstimo e uso de equipamentos de seus laboratórios para que a minha coleta de dados fosse viabilizada no Laboratório de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia (LPFisFar).

A todos os colegas e professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela amizade e incentivo.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá (1910-1997)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Historicamente, o grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFIEX), liderado pela professora Ana Cristina Rodrigues Lacerda tem investigado os efeitos do exercício físico nas doenças crônicas mais prevalentes (AVELAR *et al.*, 2011a; AVELAR *et al.*, 2011b; BRAZ *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2014; SIMAO *et al.*, 2012; TOSSIGE-GOMES *et al.*, 2012). Desta forma, surgiu o interesse em estudar a Hipertensão Arterial Sistêmica que foi inserida dentro deste contexto por se tratar de uma doença crônica comum (WOLF-MAIER *et al.*, 2003) que apresenta alta prevalência (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2013).

A escolha do tema desta tese surgiu de hipóteses levantadas previamente no mestrado que teve como objetivo investigar as respostas cardiovasculares e termorregulatórias de homens hipertensos durante o exercício de intensidade moderada e recuperação pós-exercício físico. O estudo mostrou que indivíduos hipertensos apresentam dissipação de calor produzido aprimorada, e, conseqüentemente, maior resfriamento corporal durante a recuperação de exercício físico de intensidade moderado (FONSECA *et al.*, 2015). Dentre as hipóteses que explicariam os resultados do estudo, destacou-se a contribuição do sistema colinérgico central, resultante da própria hipertensão arterial sistêmica, que poderia ter aumentado a sudorese via ativação autonômica simpática colinérgica e/ou por meio da modulação de outras vias centrais (serotonérgica, dopaminérgica e noradrenérgica). Promovendo, desta forma, redução do drive simpático adrenérgico para os vasos periféricos, favorecendo maior condução de calor para a periferia e maior dissipação de calor em hipertensos. Estes resultados substanciam dados da literatura que mostraram que a ativação colinérgica central desempenha papel importante na modulação do tônus simpático e ativação de mecanismos de dissipação de calor (FEHLNER and GORDON, 1985; LIN *et al.*, 1980; PIRES *et al.*, 2007; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007), promovendo aumento da temperatura da cauda (FEHLNER and GORDON, 1985; LIN *et al.*, 1980; PIRES *et al.*, 2007; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007), redução da temperatura corporal interna e aumento da dissipação de calor em ratos Wistar (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009). Além disso, as respostas termorregulatórias induzidas por estimulação colinérgica central são dependentes do sistema cardiovascular (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010) e parecem ser mediadas primariamente pela ativação de baroaférentes aórticos e carotídeos (PIRES *et al.*, 2010), indicando que a dissipação de calor cutânea, induzida pela ativação central, não é um reflexo puramente termorregulatório.

Assim, considerando que:

1) Na hipertensão arterial há déficit termorregulatório possivelmente devido à maior atividade simpática cutânea que leva à intolerância ao calor por atenuação dos mecanismos de vasodilatação da cauda (KELLOGG *et al.*, 1998; O'LEARY and WANG, 1994).

2) O fluxo sanguíneo da cauda é o principal mecanismo de perda de calor durante o repouso e exercício físico em ratos (SHELLOCK and RUBIN, 1984a; WILSON *et al.*, 1978).

3) O tônus vasoconstritor é modulado pela atividade barorreflexa (JOHNSON and GILBEY, 1998; OWENS *et al.*, 2002; RATHNER *et al.*, 2008).

Acreditamos que a estimulação colinérgica central, via injeção intracerebroventricular (icv) de fisostigmina (fis), reduziria o tônus simpático inerente da hipertensão, afetando positivamente o balanço de térmico em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) durante o repouso e exercício físico. Assim, a presente tese objetivou verificar a participação do sistema colinérgico central na modulação das respostas cardiovasculares e termorregulatórias de ratos SHR em repouso e durante o exercício físico moderado.

RESUMO

Existem evidências que a estimulação colinérgica central aumenta a dissipação de calor em ratos normotensos como consequência de alterações cardiovasculares via modulação da atividade barorreflexa. No entanto, não há dados publicados sobre o envolvimento do sistema colinérgico central nestas respostas em modelo experimental que apresenta alteração da sensibilidade dos barorreceptores e déficit termorregulatório. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das repostas cardiovasculares e termorregulatórias durante o repouso e exercício físico em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Ratos Wistar machos ($n = 33$) e SHR ($n = 33$) foram implantados com uma cânula intracerebroventricular (icv) para injeções de 2 μ L de fisostigmina (fis) ou solução salina (sal). Temperaturas da cauda (T_{cauda}) e corporal interna (T_{int}), pressão arterial sistólica (PAS), frequência cardíaca (FC) e taxa metabólica foram registradas durante os 60 minutos em que os ratos permaneceram em repouso, bem como durante o exercício físico até a fadiga após injeções icv randomizadas. Na situação repouso, o tratamento com fis iniciou uma sucessão de repostas cardiovasculares e termorregulatórias que resultaram em aumento da PAS, redução da FC e aumento de T_{cauda} nos grupos Wistar e SHR. A magnitude da ativação desses mecanismos foi mais intensa no SHR, afetando a T_{int} e melhorando a dissipação de calor. Durante o exercício físico, o tratamento com fis foi capaz de modular as repostas cardiovasculares promovendo aumento significativo da PAS, seguido de bradicardia reflexa em ratos SHR e Wistar. Estas repostas foram mais intensas nos ratos Wistar. Não houve diferença significativa para a T_{cauda} e T_{int} no grupo SHR fis em relação ao grupo sal. Entretanto, fis impactou positivamente no desempenho físico. Em conjunto, esses resultados fornecem evidências que, durante a situação de repouso, a estimulação colinérgica central modula as repostas termorregulatórias por meio de mudanças no sistema cardiovascular de ratos Wistar e SHR, sendo que essas repostas são mais acentuadas em ratos SHR impactando na dissipação de calor. Durante o exercício físico, a administração central de fis promove alterações no sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos. Apesar dessas alterações não terem sido suficientes para ajustar as repostas termorregulatórias em ratos SHR, impactaram positivamente no desempenho físico.

Palavras-chave: fisostigmina, hipertensão, termorregulação, pressão arterial, exercício.

ABSTRACT

There is evidence that central cholinergic stimulation increases heat dissipation in normotensive rats through changes on the cardiovascular system via modulation of baroreceptors function. However, there is no published data regarding the involvement of the central cholinergic system in cardiovascular and thermoregulatory responses in spontaneously hypertensive rats (SHR), which are animals that possess altered baroreceptor sensitivity and thermoregulatory deficit. Therefore, the aim of this study was to verify the involvement of the central cholinergic system in cardiovascular and thermoregulatory adjustments in SHR. Male Wistar ($n = 33$) and SHR ($n = 33$) rats were implanted with an intracerebroventricular (icv) cannula for injections of 2 μ L of physostigmine (phy) or saline (sal) solution. Tail (T_{tail}) and internal body temperatures (T_{int}), systolic arterial pressure (SAP), heart rate (HR) and metabolic rate were registered during 60 minutes while the animals remained at rest and during exercise until fatigue after randomly receiving the injections. Phy treatment started a succession of cardiovascular and thermoregulatory responses that resulted in increased SAP, reduced HR and increased T_{tail} in both Wistar and SHR groups. The magnitude of the activation of these mechanisms seems to be more intense in SHR, even affecting the T_{int} , and improve heat dissipation. During physical exercise, the phy treatment was able to modulate the cardiovascular responses promoting a significant increase of SAP, followed by reflex bradycardia in SHR and Wistar rats. These responses were more intense in Wistar rats. There was no significant difference for T_{tail} and T_{int} in the SHR group, however, phy positively impacted the physical performance. Taken together, these results provide evidence that at rest the central cholinergic stimulation modulates thermoregulatory responses through changes in the cardiovascular system of Wistar and SHR rats, and SHR rats presented greater cardiovascular and thermoregulatory responses than normotensive rats after central cholinergic stimulation. During physical exercise the central administration of phy promotes adjustments in the cardiovascular system of normotensive and hypertensive rats. Although these adjustments were not sufficient to pair the thermoregulatory responses in SHR rats, they had a positive impact on physical performance.

Keywords: physostigmine, hypertension, thermoregulation, blood pressure, exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Respostas termorregulatórias e metabólicas de ratos Wistar durante exercício moderado realizado na esteira até fadiga	19
Figura 2 – Representação esquemática da neurotransmissão colinérgica	20
Figura 3 – Interação entre barorreceptores arteriais, reflexo pressor do exercício físico e vias centrais	22
Figura 4 – Desenho esquemático da hipótese do estudo	27
Figura 5 - Figura representativa das sequências experimentais do estudo	29
Figura 6 – Representação esquemática da canulação arterial	32
Figura 7 – Sequência metodológica dos experimentos	33
Figura 8 – Registro da pressão arterial pulsátil de um rato Wistar durante o repouso após receber injeção icv de fisostigmina	35
Figura 9 – Painel do domínio da frequência do software Cardioseries	36
Figura 10 – Delta (Δ) do perfil temporal das respostas termorregulatórias, cardiovasculares e metabólicas de ratos Wistar e SHR durante o repouso	40
Figura 11 - Magnitude das diferenças percentuais (%) entre os grupos Wistar fis e SHR fis em comparação com o controle correspondente	43
Figura 12 – Efeitos da injeção icv de fisostigmina ou salina sobre a densidade espectral da pressão sistólica e frequência cardíaca de ratos Wistar e SHR durante os 15 primeiros minutos do repouso	44
Figura 13 - Correlação entre o delta (Δ) dos parâmetros cardiovasculares e termorregulatórios durante os primeiros 15 minutos do repouso após injeções icv de fisostigmina ou salina	46
Figura 14 – Correlação entre a área integrada sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS ASC) e a área integrada sob a curva da frequência cardíaca (FC ASC) com a integrada área sob a curva da temperatura da cauda (Tcauda ASC) durante os primeiros 15 minutos do repouso em ratos Wistar e SHR após injeções icv de fisostigmina ou salina	47
Figura 15 - Perfil temporal das respostas termorregulatórias e cardiovasculares de ratos Wistar e SHR durante o exercício físico	56
Figure 16 - Perfil temporal do consumo de oxigênio de ratos Wistar e SHR durante o exercício físico	57
Figura 17 - Magnitude das diferenças percentuais (%) entre os grupos Wistar fis e SHR fis em comparação com o controle correspondente durante o exercício	59

Figura 18 - Correlação entre os parâmetros cardiovasculares e termorregulatórios durante o exercício físico após injeções icv de fisostigmina ou salina	60
Figura 19 - Tempo total de exercício de ratos Wistar e SHR	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alterações temporais nas respostas cardiovasculares e termorregulatórias durante o repouso	42
Tabela 2 – Análise de regressão simples para predição das variáveis cardiovasculares e termorregulatórias em ratos SHR	47
Tabela 3 – Alterações temporais nas respostas cardiovasculares e termorregulatórias durante o exercício físico	58
Tabela 4 – Análise de regressão simples para predição das variáveis cardiovasculares e termorregulatórias em ratos Wistar	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CVLM - Bulbo ventrolateral caudal

DMV - Núcleo motor dorsal do vago

EPR - Receptores do músculo esquelético

FC - Frequência cardíaca

Fis - Fisostigmina

HF – Alta frequência

icv - Intracerebroventricular

LF – Baixa frequência

NA - Núcleo ambíguo

NTS - Núcleo do trato solitário

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PAS - Pressão arterial sistólica

PVN - Núcleo paraventricular do hipotálamo

RVLM - Bulbo ventrolateral rostral

Sal - Salina

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

T_{cauda} - Temperatura da cauda

T_{int} – Temperatura colônica

VCO₂ - Produção de dióxido de carbono

VLf – Muito baixa frequência

VO₂ - Consumo de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Termorregulação	17
1.2 Termorregulação durante o exercício físico.....	18
1.3 Neurotransmissão colinérgica	20
1.4 Barorreceptores carotídeos	21
1.5 Ratos espontaneamente hipertensos	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 HIPÓTESE	28
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo geral	28
4.2 Objetivos específicos	28
5 MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Similaridade entre os estudos	30
5.1.1 Animais	30
5.1.2 Pletismografia de cauda	30
5.1.3 Procedimentos cirúrgicos	30
5.1.4 Canulação intracerebroventricular	31
5.1.5 Canulação arterial	31
5.1.6 Injeção intracerebroventricular	33
5.1.7 Controle da temperatura ambiente	33
6 ESTUDO 1	34
6.1 Experimento 1	34
6.1.1 Animais	29
6.1.2 Familiarização com sensores de temperatura	34
6.1.3 Protocolo experimental	34
6.1.4 Temperatura corporal interna	34
6.1.5 Temperatura da cauda	35
6.1.6 Pressão arterial e frequência cardíaca	35
6.1.7 Variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca	36
6.2 Experimento 2	37
6.2.1 Animais	37
6.2.2 Familiarização com as câmaras metabólicas	37

6.2.3 Protocolo experimental	37
6.2.4 Taxa metabólica	38
6.3 Análise estatística	38
6.4 Resultados	38
6.5 Discussão	48
6.6 Conclusão	52
7 ESTUDO 2	53
7.1 Experimento 1	53
7.1.1 Animais	53
7.1.2 Familiarização com sensores de temperatura	53
7.1.3 Protocolo experimental	53
7.1.4 Parâmetros termorregulatórios e cardiovasculares	54
7.1.5 Tempo total de exercício	54
7.2 Experimento 2	54
7.2.1 Animais	54
7.2.2 Familiarização com atividade física	54
7.2.3 Protocolo experimental	54
7.2.4 Taxa metabólica	55
7.3 Análise estatística	55
7.4 Resultados	55
7.5 Discussão	62
7.6 Conclusão	64
8 CONCLUSÃO GERAL	65
9 REFERÊNCIAS	66
ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	78
APÊNDICE A: ARTIGO 1	79
APÊNDICE B: ARTIGO 2	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Termorregulação

O controle central da termorregulação ocorre principalmente no hipotálamo. A ativação dos mecanismos responsáveis pela produção e dissipação de calor dependem principalmente do *feedback* negativo da temperatura corporal interna, enquanto os sinais térmicos cutâneos fornecem *feedback* auxiliar negativo ou positivo, reduzindo o tempo de resposta do sistema e tornando a temperatura corporal interna mais estável (ROMANOVSKY *et al.*, 2009).

Este controle acontece por meio de processos termorregulatórios efetores (autonômicos e comportamentais). Em ratos, os mecanismos comportamentais incluem alteração da atividade locomotora, ingestão de alimentos, ajustes posturais, escolha da temperatura ambiental de preferência (GORDON, 1990; NAGASHIMA *et al.*, 2000; ROMANOVSKY *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2003) e espalhamento de saliva sobre o corpo (SCHWIMMER *et al.*, 2004). Os efetores autonômicos incluem a termogênese induzida ou não por tremor, o controle do tônus vasomotor cutâneo, assim como a perda evaporativa de calor pela respiração (GORDON, 1990; NAGASHIMA *et al.*, 2000). Além disso, existem mecanismos de troca “seca” (Newtoniana) e “úmida” com o ambiente, sendo que a troca Newtoniana pode ser facilitada pelos ajustes do tônus vasomotor cutâneo (IUPS, 2001).

O fluxo sanguíneo cutâneo constitui importante mecanismo de troca de calor com ambiente, contribuindo com a regulação térmica. Assim, o aumento do fluxo de sangue para a pele por meio da vasodilatação cutânea facilita a dissipação de calor a partir do resfriamento sanguíneo na superfície da pele (OOTSUKA and TANAKA, 2015). Anastomoses arteriovenosas desempenham um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo cutâneo. A dilatação de anastomoses arteriovenosas reduzem a resistência ao fluxo sanguíneo, aumentam o volume vascular cutâneo e, assim, proporcionam mais sangue para a pele (GRAYSON, 1951; OOTSUKA and TANAKA, 2015).

Em ratos, a dissipação de calor ocorre principalmente por meio da vasodilatação cutânea da cauda (GISOLFI *et al.*, 1980), mecanismo responsável por aproximadamente 25% da dissipação de calor em repouso (YOUNG and DAWSON, 1982). Adicionalmente, a cauda representa 7% da área de superfície corporal total do rato (GORDON, 1990), sendo considerada um tecido altamente especializado na troca de calor com o meio ambiente, uma vez que possui alta vascularização com presença de anastomoses arteriovenosas permitindo

modificações do fluxo sanguíneo em resposta aos estímulos termorregulatórios (ROMANOVSKY *et al.*, 2002). Além disso, possui uma artéria ventral e duas veias laterais principais, em que o sangue é direcionado da artéria ventral para as veias laterais através das anastomoses quando existe a necessidade de dissipar calor (YOUNG and DAWSON, 1982).

O controle do fluxo sanguíneo para a cauda é realizado pelo sistema nervoso autônomo simpático (O'LEARY and JOHNSON, 1989), podendo ser ativado a partir da estimulação colinérgica central por meio da modulação de barorreceptores arteriais (PIRES *et al.*, 2010), promovendo aumento da temperatura da cauda de ratos (FEHLNER and GORDON, 1985; LIN *et al.*, 1980; PIRES *et al.*, 2007; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007), redução da temperatura corporal interna e aumento da dissipação de calor durante o repouso e exercício físico (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2004).

1.2 Termorregulação durante o exercício físico

Durante o exercício físico, as taxas de produção e dissipação de calor apresentam respostas temporais diferentes, sendo que ocorre aumento imediato na produção de calor e um atraso na dissipação de calor, de tal modo que a temperatura interna eleva-se rapidamente no início do exercício (WEBB, 1995). O aquecimento corporal interno excessivo pode induzir o choque hipertérmico, o qual está associado ao quadro de endotoxemia, podendo levar à morte em situações extremas (GISOLFI, 2000). Assim, condições de estresse por aquecimento corporal no qual podem ocorrer aumentos significativos na quantidade de calor acumulado, como o exercício físico, representam um desafio à homeostasia corporal (GONZALEZ-ALONSO *et al.*, 2008).

Em roedores, durante a fase inicial do exercício a produção de calor aumenta rapidamente em função do aumento da atividade muscular que induz maior oxidação de substratos energéticos, resultando em aumento da taxa metabólica (LACERDA *et al.*, 2006). Além disso, ocorre redução da temperatura da cauda devido à vasoconstrição periférica mediada pelo simpático (HARTLEY *et al.*, 1972; LACERDA *et al.*, 2005; McALLISTER *et al.*, 1995; WANNER *et al.*, 2015). Logo, ocorre aumento da temperatura corporal interna em resposta ao desequilíbrio temporário nas taxas de produção e dissipação de calor durante os primeiros minutos de exercício (LACERDA *et al.*, 2005; LACERDA *et al.*, 2006). Consequentemente, a temperatura corporal interna aumenta rapidamente até atingir o limiar térmico para a vasodilatação periférica, melhorando assim a dissipação de calor (LACERDA *et al.*, 2006). O

fluxo sanguíneo da cauda é responsável por até 45% dissipação da produção de calor em ratos durante o exercício (SHELLOCK and RUBIN, 1984b; WILSON *et al.*, 1978). Após alguns minutos de exercício, a temperatura da cauda se estabiliza, as taxas de produção e dissipação de calor se equilibram, e a temperatura corporal interna atinge um platô (LACERDA *et al.*, 2005; WANNER *et al.*, 2015). À medida que o exercício continua, a temperatura corporal interna segue aumentando lentamente até a fadiga, fazendo com que o animal voluntariamente cesse o exercício (LACERDA *et al.*, 2005) (figura 1).

Essas respostas se assemelham a repostas termorregulatórias observadas em humanos (WEBB, 1995).

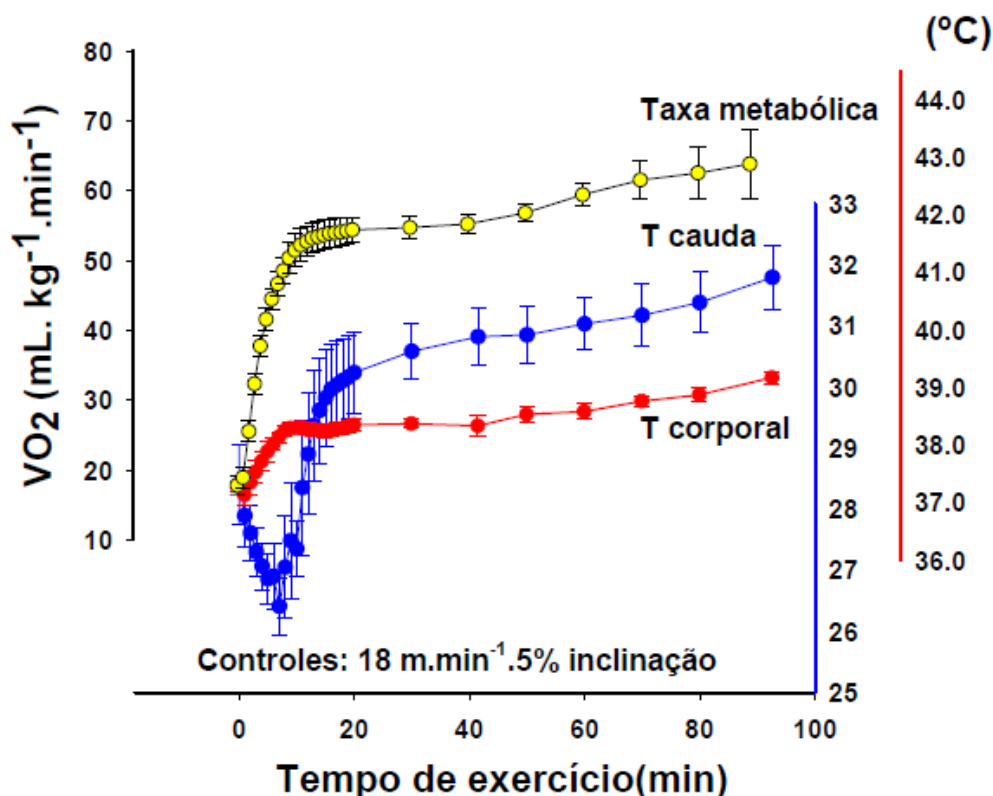


Figura 1. Respostas termorregulatórias e metabólicas de ratos Wistar ($n = 6$) durante exercício moderado (18 m.min⁻¹, 5% inclinação) realizado na esteira até fadiga (temperatura ambiente 21 ± 2 °C). Temperatura da cauda: Tcauda; Temperatura corporal interna: Tcorporal. Dados são apresentados como média \pm SEM. Aumento exponencial rápido na taxa metabólica e na temperatura corporal, seguido de estabilização com o valor mais alto atingido no momento da fadiga. Ver texto para mais detalhes. [Adaptado de Lacerda, 2006].

1.3 Neurotransmissão colinérgica

O sistema colinérgico central constitui uma das vias que participa do controle da termorregulação (FEHLNER and GORDON, 1985). A acetilcolina é o principal neurotransmissor colinérgico cerebral, que, em conjunto com seus receptores e enzimas responsáveis por sua síntese, armazenamento e degradação, constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (figura 2).

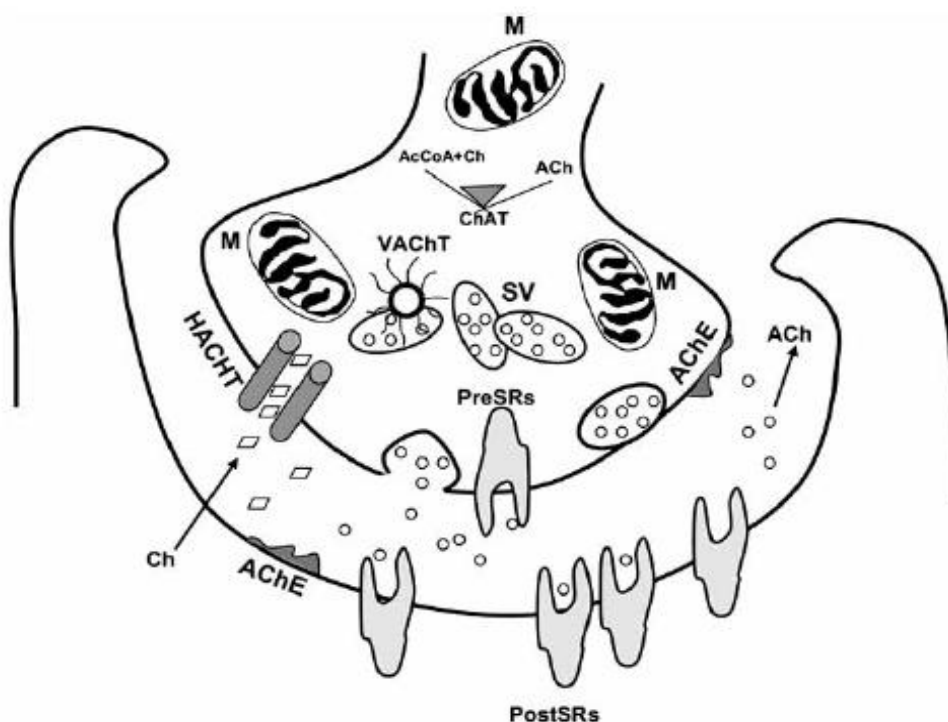


Figure 2. Representação esquemática da neurotransmissão colinérgica. ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterase; Acetil-CoA: acetil-coenzima A; Ch: colina; ChAT: acetiltransferase; HACHT: transportador de alta afinidade da colina; M: mitocôndrias; PreSRs: receptores pré-sinápticos; PostSRs: receptores pós-sinápticos; SV: vesículas sinápticas; VChT: enzima transportadora vesicular de acetilcolina. Ver texto para mais detalhes. [Adaptado de Amenta e Taybati, 2008].

A acetilcolina é biossintetizada no citosol do terminal pré-sináptico a partir dos substratos acetil-coenzima A e colina pela ação da enzima acetiltransferase (AMENTA and TAYEBATI, 2008; PRADO *et al.*, 2002). A acetilcolina é armazenada em vesículas sinápticas pela ação da enzima transportadora vesicular de acetilcolina (AMENTA and TAYEBATI, 2008; DE CASTRO *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2006)

que, em resposta ao potencial de ação, se fundem com a membrana plasmática esvaziando seu conteúdo na fenda sináptica por exocitose. A acetilcolina liberada na fenda sináptica é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AMENTA and TAYEBATI, 2008; HRABOVSKA and KREJCI, 2014) em colina e acetato, sendo que, parte da colina derivada da hidrólise de acetilcolina é recuperada por um transportador de colina de alta afinidade para ser utilizada para a síntese de novas moléculas de acetilcolina (AMENTA and TAYEBATI, 2008; PRADO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2006).

A fisostigmina (fis), um anticolinesterásico de ação central, pode se ligar a acetilcolinesterase reversivelmente (MATTHEW *et al.*, 1992) bloqueando sua ação, e assim permitindo que a acetilcolina permaneça por mais tempo na fenda sináptica (SILMAN and SUSSMAN, 2005) e ativando o sistema colinérgico.

A fisostigmina é uma amina terciária (ALDERDICE, 1979) que exerce uma inibição estéreo-seletiva, agindo como um pseudo substrato e transferindo um resíduo de carbamato para o local ativo da enzima acetilcolinesterase. A função da enzima acetilcolinesterase é regenerada por hidrólise espontânea (TRIGLLE *et al.*, 1998).

A administração intracerebroventricular (icv) de fis tem sido amplamente utilizada para a compreensão da resposta termorregulatória por seus efeitos hipotérmicos (DAMASCENO *et al.*, 2015; FEHLNER and GORDON, 1985; LIN *et al.*, 1980; PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Além disso, as respostas termorregulatórias induzidas por estimulação colinérgica central por meio da fis ocorrem em paralelo às mudanças no sistema cardiovascular (PIRES *et al.*, 2007). O aumento da temperatura da cauda (T_{cauda}) causado por injeção icv de fis foi correlacionado com alta pressão arterial sistólica (PAS) (PIRES *et al.*, 2007). Há evidências de que as sinapses colinérgicas centrais desempenham um papel importante no controle da função neural cardiovascular. Ainda, segundo Pires e colaboradores (2010), o efeito hipertensivo da ativação colinérgica central promove maior ativação de barorreceptores carotídeos que parecem estar diretamente relacionados ao aumento da dissipação de calor induzido pela estimulação colinérgica central.

1.4 Barorreceptores carotídeos

Os barorreceptores arteriais tem a função primária em curto prazo de corrigir alterações e oscilações da pressão arterial (PA) (COLLINS *et al.*, 2001; MICHELINI *et al.*, 2015),

modificando o fluxo simpático e parassimpático (MICHELINI *et al.*, 2015), que resulta em respostas apropriadas de controle do débito cardíaco e resistência vascular periférica para manter a pressão em valores normais (COLLINS *et al.*, 2001; MICHELINI *et al.*, 2015).

Ao contrário do que acontece em repouso, em que aumentos na PA são acompanhados de bradicardia reflexa e vasodilatação, durante o exercício ocorre aumento simultâneo da PA e da frequência cardíaca (FC), aumentando o aporte sanguíneo para a musculatura ativa, fornecendo o oxigênio necessário e suprimento de glicose para as contrações musculares (KOGA *et al.*, 2014). Esse controle ocorre devido ao reajuste do barorreflexo em um maior valor de PA, ou seja, um novo ponto de ajuste (figura 3).

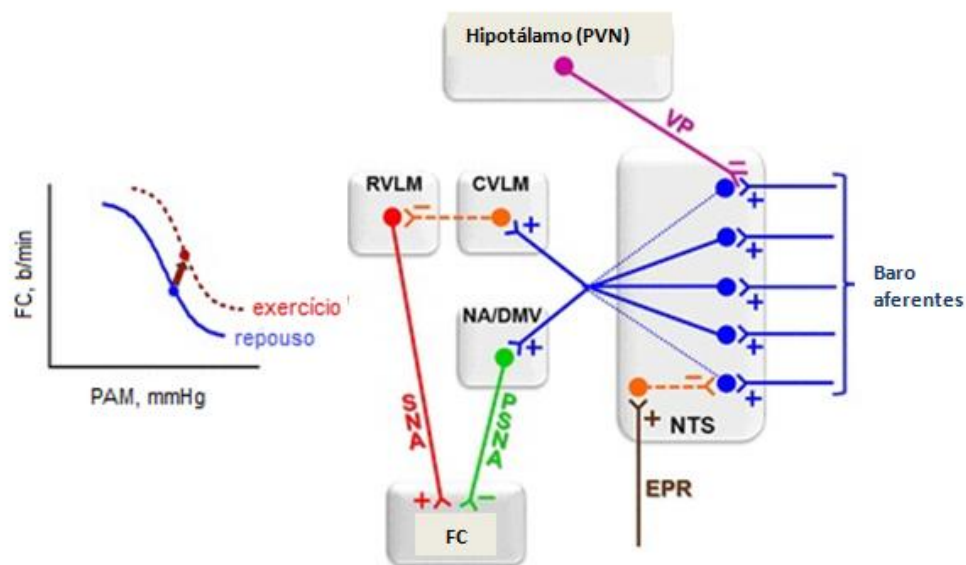


Figura 3. Interação entre barorreceptores arteriais, reflexo pressor do exercício físico (EPR) e vias hipotalâmicas vasopressinérgicas (VP) que se projetam para os neurônios de segunda ordem no núcleo do trato solitário (NTS). Durante o exercício, ambos EPR (por meio de projeção GABAérgica) e VP (por meio de uma sinapse inibitória axo-axonal) inibem parcialmente aferentes barorreceptores, limitando o grau de baroinibição do coração durante aumento da pressão arterial. Estes efeitos induzidos pelo exercício reajustam instantaneamente a função do barorreflexo (esquerda). Em azul: vias glutamatérgicas excitatórias; laranja: vias inibitórias GABAérgicas; rosa: projeções vasopressinérgicas descendentes; verde: atividade do sistema nervoso parassimpático (PSNA); vermelho: atividade nervosa simpática (SNA) para o coração; CVLM: bulbo ventrolateral caudal; RVLM: bulbo ventrolateral rostral; NA: núcleo ambíguo; DMV: núcleo motor dorsal do vago; FC: frequência cardíaca. Ver texto para mais detalhes. [Adaptado de Michelini *et al.*, 2015].

A ativação dos barorreceptores durante o aumento transiente de PA em repouso promove forte excitação de neurônios de segunda ordem, localizados no núcleo do trato solitário

(NTS), resultando em aumento da saída vagal (por meio da ativação dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados no núcleo motor dorsal do vago [DMV] e núcleo ambíguo [NA]). Paralelamente, ocorre a retirada da atividade do sistema tônus simpático para o coração e vasos sanguíneos, mediada pela ativação de neurônios GABAérgicos que se projetam a partir do bulbo ventrolateral caudal (CVLM) para neurônios simpáticos localizados no bulbo ventrolateral rostral (RVLM), levando à bradicardia.

Durante o exercício, há uma ativação simultânea de projeções aferentes para os neurônios de segunda ordem dentro do NTS que se originam a partir dos barorreceptores arteriais, bem como a partir dos receptores do músculo esquelético (EPR) e eferências do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). A ativação simultânea da via ascendente, por meio do *feedback* neural dos EPR, e descendente, por meio da entrada neural no PVN durante um aumento da pressão induzido pelo exercício, inibe parcialmente a ativação mediada pelos barorreceptores em neurônios de segunda ordem no NTS, reduzindo, assim, tanto a saída vagal, quanto a retirada simpática para o coração e os vasos. Estes efeitos induzidos pelo exercício reajustam instantaneamente a função do barorreflexo para um novo ponto de ajuste (MICHELINI *et al.*, 2015).

Há evidências de que a estimulação colinérgica central, por meio da administração de fis no ventrículo lateral, aumenta a PA de ratos Wistar, seguido de redução ou atenuação do aumento da FC durante o exercício físico, indicando ativação do barorreflexo (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010). Estas respostas também foram observadas em repouso. Além disso, segundo Pires e colaboradores (2007 e 2010), essas repostas foram acompanhadas de aumento da vasodilatação da cauda e posterior redução na temperatura corporal interna. Isto indica que a estimulação do sistema colinérgico central modula a perda de calor especialmente por meio do aumento da pressão sanguínea, que promove maior ativação dos barorreceptores arteriais, indicando que a dissipação de calor cutânea, induzida por fis, não é um reflexo puramente termorregulatório.

No entanto, não há dados publicados sobre o envolvimento do sistema colinérgico central nas respostas termorregulatórias e cardiovasculares em modelo experimental de hipertensão arterial que apresenta déficit termorregulatório e alteração da sensibilidade dos barorreceptores.

1.5 Ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

O Rato Espontaneamente Hipertenso (SHR), modelo animal amplamente utilizado para o estudo da hipertensão essencial, (KAI *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 1998a), apresenta sensibilidade alterada dos barorreceptores (YAMAMOTO and CLINE, 1987) e hiperatividade simpática (JUDY *et al.*, 1976). Assim, esses ratos apresentam deficiência na manutenção do equilíbrio térmico (CAMPOS *et al.*, 2014a), possivelmente devido à maior atividade simpática que atenua os mecanismos de vasodilatação da cauda (O'LEARY and WANG, 1994).

A hipertensão inicia seu desenvolvimento em idade jovem (TRIPPODO and FROHLICH, 1981) e aumenta progressivamente com o avanço da idade (PINTO *et al.*, 1998b). A pressão sanguínea começa aumentar por volta da 5ª ou 6ª semanas de idade, sendo considerados hipertensos entre a 7ª e a 15ª semana, com aumento progressivo da pressão sistólica até atingir 180 – 200 mmHg (PINTO *et al.*, 1998a). Entre 40 e 50 semanas de idade, o SHR desenvolve características de doença cardiovascular, tais como hipertrofia cardíaca e vascular (CONRAD *et al.*, 1995), insuficiência cardíaca e disfunção renal (CONRAD *et al.*, 1991; KOMATSU *et al.*, 1995).

Além disso, o SHR apresenta outras similaridades com humanos hipertensos (OKAMOTO and AOKI, 1963), incluindo hiper-responsividade simpatoadrenal e cardiovascular a estímulos estressantes (FOLKOW, 1982; TRIPPODO and FROHLICH, 1981), aumento da resistência periférica total associada a um débito cardíaco normal, bem como atividade simpática aumentada (TRIPPODO and FROHLICH, 1981).

Adicionalmente, ratos SHR e indivíduos hipertensos apresentam aumento da variabilidade da PA (FRIBERG *et al.*, 1988; VIRTANEN *et al.*, 2003), sendo que a variabilidade da PA aumenta quanto mais grave a hipertensão arterial sistêmica (MANCIA *et al.*, 1983). De acordo com a literatura vigente, o fator determinante que influencia uma maior variabilidade da PA parece ser a menor sensibilidade dos barorreceptores (Floras *et al.*, 1988; Irigoyen and Krieger, 1998). A variabilidade dos componentes da PA indica atividade simpática vascular para o componente muito baixa frequência (VLF) (RADAELLI *et al.*, 2006), bem como para o componente de baixa frequência (LF) (WAKI *et al.*, 2006) e atividade simpática cardíaca para o componente de alta frequência (HF) (YOSHIMOTO *et al.*, 2011). Para a variabilidade dos componentes da FC, os componentes VLF e LF indicam modulação autonômica mediada pelo barorreflexo (DWORKIN *et al.*, 2000; GOLDSTEIN *et al.*, 2011) e o componente HF indica atividade parassimpática cardíaca mediada pelo barreflexo e atividade ventilatória (GOLDSTEIN *et al.*, 2011). Estes componentes podem ser utilizados como indicadores da atividade autonômica em várias condições fisiológicas

(BRENNER *et al.*, 1998). Diminuição na variabilidade da FC tem sido relatada em indivíduos hipertensos (HUIKURI *et al.*, 1996; LANGEWITZ *et al.*, 1994; LIAO *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, 1998; VIRTANEN *et al.*, 2003). Ao encontro desses achados, ratos normotensos com denervação sino-aórtica apresentaram redução da variabilidade da FC, especialmente do componente VLF (PIRES *et al.*, 2013; TANG and DWORKIN, 2009). Segundo Tang e Dworkin (2009), a efetividade barorreflexa máxima em modular o sistema autonômico para ajustar a PA ocorre na extensão de muito baixa frequência. Assim, a análise da variabilidade da PA e FC tornou-se de grande relevância devido à sua facilidade de aplicação por ser um método não invasivo e seu potencial uso clínico (PIRES *et al.*, 2013).

Em adição, o SHR apresenta grande sensibilidade à estimulação colinérgica central (BUCCAFUSCO and SPECTOR, 1980; BUCCAFUSCO *et al.*, 1990; HOFFMAN *et al.*, 1978; KUBO and TATSUMI, 1979; MAKARI *et al.*, 1989) devido a modificações centrais em termos de receptores e enzimas (LAZARTIGUES *et al.*, 1999). A sensibilidade à estimulação colinérgica central é demonstrada após administração intravenosa do inibidor de colinesterase de ação central, fis, que evoca aumento na resposta hipertensiva no SHR (BUCCAFUSCO AND SPECTOR, 1980; BUCCAFUSCO *et al.*, 1990; KUBO and TATSUMI, 1979; MAKARI *et al.*, 1989).

Estudo anterior mostrou que o aumento da PAS induzida por fis pode modular as respostas termorregulatórias de dissipação de calor (PIRES *et al.*, 2007) por meio de mecanismos não termorregulatórios, mediados possivelmente por ativação de baroaferentes carotídeos e aórticos em ratos normotensos (PIRES *et al.*, 2010). Além disso, a estimulação colinérgica foi capaz de aumentar a variabilidade da FC e sensibilidade barorreflexa em ratos Wistar (SOARES *et al.*, 2004b). Entretanto, até o momento, não há dados publicados sobre o envolvimento o sistema colinérgico central na modulação das repostas cardiovasculares e termorregulatórias em modelo que apresenta sensibilidade alterada dos barorreceptores e déficit termorregulatório durante o repouso e exercício físico realizado até a fadiga.

2 JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial é um problema comum e importante de saúde pública mundial (WOLF-MAIER *et al.*, 2003). No Brasil, a hipertensão arterial sistêmica atinge 24,3% da população adulta, podendo chegar a 59,2% após os 65 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2013).

O rato SHR tem sido amplamente utilizado como um modelo animal para o estudo da hipertensão essencial humana por apresentar diversas similaridades com a hipertensão humana (OKAMOTO and AOKI, 1963; TRIPPODO and FROHLICH, 1981), incluindo alteração da sensibilidade dos barorreceptores arteriais (YAMAMOTO and CLINE, 1987) e hiperatividade simpática (JUDY *et al.*, 1976). Assim, os ratos SHR apresentam deficiência na manutenção da homeostase térmica (CAMPOS *et al.*, 2014a), possivelmente devido à maior atividade simpática que leva à atenuação dos mecanismos de vasodilatação da cauda (O'LEARY and WANG, 1994). O fluxo sanguíneo da cauda é o principal mecanismo de perda de calor em ratos (SHELLOCK AND RUBIN, 1984a; WILSON *et al.*, 1978) e pode ser modulado pela atividade simpática adrenérgica (O'LEARY *et al.*, 1985).

A estimulação colinérgica central por meio da injeção icv de fis aumenta o fluxo sanguíneo da cauda do animal (FEHLNER and GORDON, 1985; LIN *et al.*, 1980; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007) e promove aumento da dissipação de calor durante o repouso em ratos Wistar (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007) e atenua a hipertermia induzida pelo exercício físico (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2004). Além disso, as respostas termorregulatórias induzidas pela estimulação colinérgica central são dependentes do sistema cardiovascular (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010) e parecem ser mediadas primariamente pela ativação de baroaferentes aórticos e carotídeos (PIRES *et al.*, 2010).

Assim, uma vez que a maior atividade simpática observada em SHR parece levar à intolerância ao calor, diminuindo a dissipação de calor por meio de mecanismos de vasodilatação da cauda (O'LEARY e WANG 1994, KELLOGG *et al.*, 1998), acreditamos que a estimulação colinérgica central via injeção icv de fis reduziria o tônus simpático inerente da hipertensão, afetando positivamente o balanço de calor em ratos SHR durante o repouso e exercício físico na esteira até fadiga.

Essa hipótese baseia-se em evidências de que: 1) a estimulação colinérgica central por fis modula as respostas termorregulatórias de dissipação de calor por meio de mudanças no sistema cardiovascular (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2008); 2) a regulação da temperatura corporal interna pode ser modulada pela ativação dos barorreceptores arteriais (PIRES *et al.*, 2010); 3) existem evidências que o tônus simpático cutâneo é modulado pela atividade barorreflexa (JOHNSON and GILBEY, 1998; OWENS *et al.*, 2002; RATHNER *et al.*, 2008); 4) o sistema colinérgico central influencia a resposta pressórica e, conseqüentemente, a perda de calor por meio do aumento da temperatura da cauda (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010); 5) ratos SHR apresentam maior sensibilidade

à estimulação colinérgica central devido a modificações centrais em termos de receptores e enzimas (LAZARTIGUES *et al.*, 1999) (figura 4).

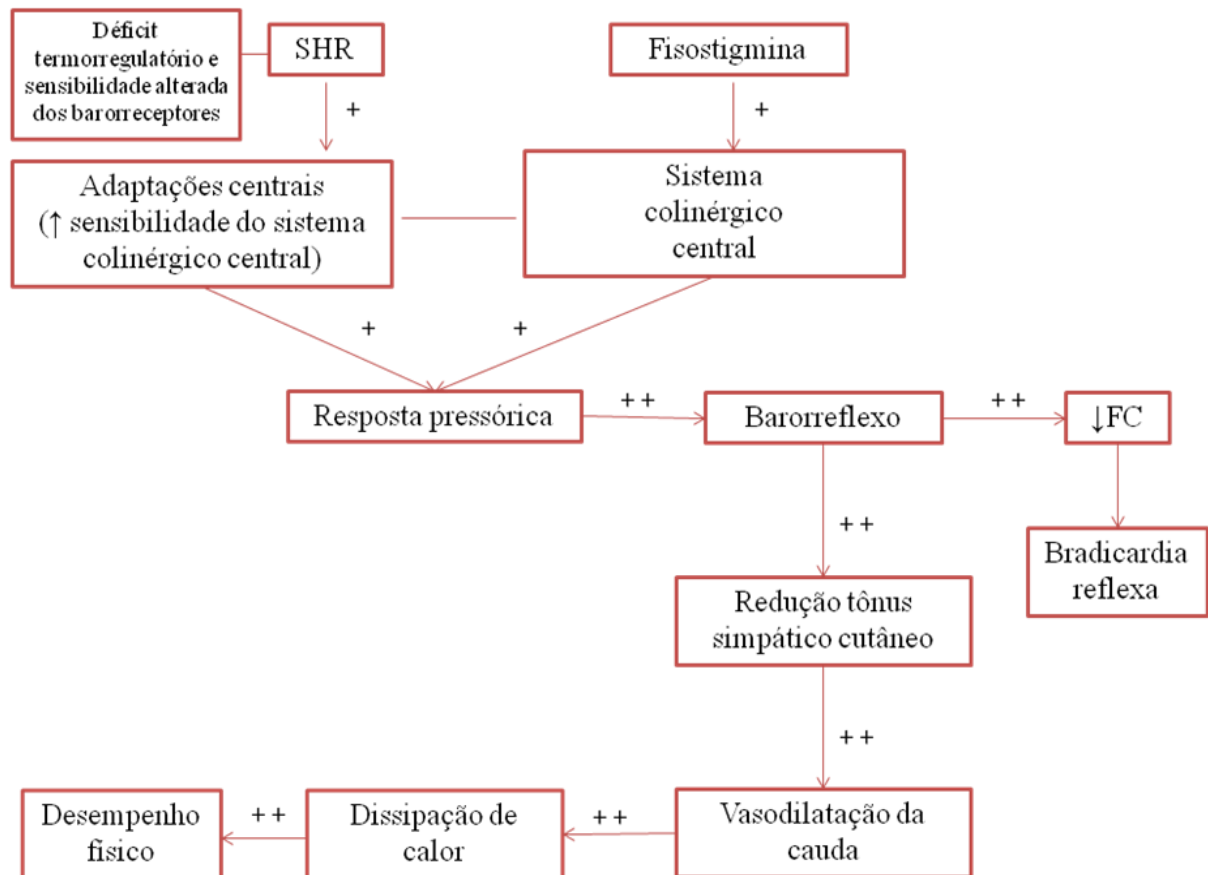


Figura 4: Desenho esquemático da hipótese.

Apesar de vários autores terem investigado os efeitos da estimulação colinérgica central nas repostas termorregulatórias (DAMASCENO *et al.*, 2015; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009; WANNER *et al.*, 2007) e cardiovasculares (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010), nenhum estudo até o momento verificou o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das repostas cardiovasculares e, conseqüentemente, nas repostas termorregulatórias em ratos SHR.

Além disso, estudos com modelo animal têm sido amplamente realizados para melhor compreender as vias centrais envolvidas com o balanço térmico durante repouso e exercício físico na esteira rolante (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009; WANNER *et al.*, 2007). Apesar de algumas restrições, os resultados encontrados em estudos com modelo animal podem ser aplicados para o

entendimento em seres humanos. Estes estudos são fundamentais para se avaliar questões que exigem a utilização de métodos invasivos, conferindo maior validade aos estudos realizados com ratos. Assim, acreditamos que os resultados encontrados possibilitarão um entendimento mais global acerca do controle termorregulatório e cardiovascular na hipertensão arterial em repouso e durante o desafio pelo exercício físico.

3 HIPÓTESE

Em ratos SHR, a estimulação colinérgica central via injeção icv de fis reduziria o tônus simpático inerente à hipertensão, por meio de mudanças no sistema cardiovascular (aumento da resposta pressórica e bradicardia reflexa), modulando positivamente o balanço de calor (aumento da temperatura da cauda e maior dissipação de calor) durante o repouso. Durante o desafio pelo exercício físico na esteira até fadiga, a estimulação colinérgica central promoveria ajustes similares ao repouso que impactariam positivamente no desempenho físico.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das respostas cardiovasculares e termorregulatórias em repouso e durante exercício físico realizado até a fadiga em ratos SHR.

4.2 Objetivos específicos

- ❖ Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das respostas termorregulatórias (T_{cauda} e T_{int}), cardiovasculares (PA e FC) e no consumo de oxigênio (VO_2) em repouso em ratos SHR e ratos Wistar.
- ❖ Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das respostas termorregulatórias (T_{cauda} e T_{int}), cardiovasculares (PA e FC) e no consumo de oxigênio (VO_2) induzido pelo exercício físico moderado até a fadiga em ratos SHR e ratos Wistar.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Protocolo Número 039/2014) (anexo 1).

Foram realizados quatro experimentos: 1) o primeiro foi realizado para verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das repostas cardiovasculares e termorregulatórias em situação de repouso; 2) o segundo verificou o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação da taxa metabólica em situação de repouso; 3) o terceiro foi realizado para verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das repostas cardiovasculares e termorregulatórias durante o exercício físico; 4) o último experimento foi realizado para verificar a participação do sistema colinérgico central na modulação taxa metabólica durante o exercício físico (figura 5).

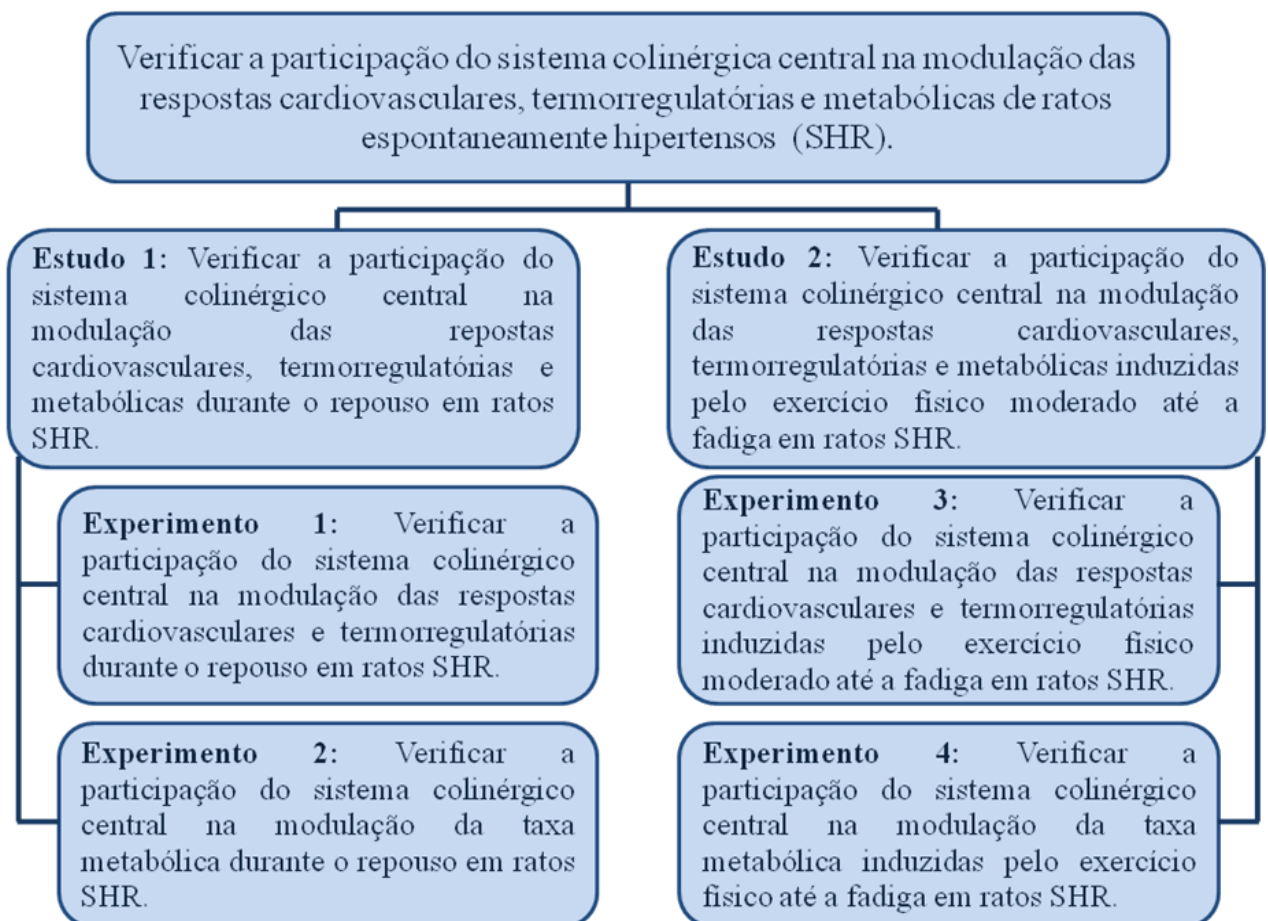


Figura 5: Figura representativa das sequências experimentais do presente estudo.

5.1 Similaridades entre os experimentos

Os procedimentos que foram comuns entre os experimentos são descritos a seguir:

5.1.1 Animais

Inicialmente foram utilizados 77 ratos Wistar e 63 ratos SHR, totalizando 140 ratos. Destes ratos, 66 animais (47,14% da amostra total) finalizaram os experimentos sem intercorrência e tiveram seus dados posteriormente analisados. A perda de animais ocorreu por vários motivos: a) posicionamento da cânula fora do ventrículo lateral direito, confirmada pela ausência da queda na coluna de líquido dentro da pipeta, b) rompimento da carótida durante a cirurgia, c) mau funcionamento da cânula arterial no dia do experimento, d) ratos que não retornaram ao peso após as cirurgias, e) ratos que não correram no dia do experimento e f) ratos que não apresentaram estado hipertensivo.

Antes das cirurgias, os animais foram mantidos coletivamente em caixas de polipropileno (até 5 ratos por caixa) e após as cirurgias foram transferidos para caixas individuais. Os ratos permaneceram sob um ciclo claro/escuro de 12-12 h com temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e tiveram livre acesso à água e ração.

Foram utilizados ratos com 16 semanas de idade, uma vez que o desenvolvimento da hipertensão no SHR é dependente da idade (CAMPOS *et al.*, 2014b; HOM *et al.*, 2007).

5.1.2 Pletismografia de cauda

Para confirmação do estado hipertensivo dos animais SHR, a PAS foi mensurada antes do início dos experimentos por meio da pletismografia de cauda (ADInstruments, MLT1025R, Plethysmograph, PowerLab, Spain). Foram incluídos nos experimentos aqueles que apresentaram $\text{PAS} \geq 150 \text{ mmHg}$ (OKAMOTO and AOKI, 1963).

5.1.3 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com ketamina-Xilazina (116 e 6 mg/kg respectivamente intraperitonealmente). Além disso, antes dos procedimentos

cirúrgicos os ratos receberam uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico veterinário, 24000 IU/ kg peso corporal). (Pires *et al.*, 2010). Analgesia pós-operatória foi fornecida assim que acordaram da anestesia (Fluxina Meglumina, 1,1mg/kg peso corporal) (PIRES *et al.*, 2010).

5.1.4 Canulação intracerebroventricular

Para o implante da cânula intracerebroventricular (16 mm de comprimento; 0,6 mm de diâmetro interno; 0,7 de diâmetro externo), foi realizada tricotomia na porção superior da cabeça e após assepsia local foi realizada uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo. Em seguida, foi injetado 0,5 mL de anestésico local e vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% e adrenalina 1:200.000; DFL, RJ, Brasil) no periósteo, permitindo seu afastamento e remoção da superfície do crânio. Os ratos foram fixados no estereotaxico para pequenos animais (Stoelting CO, Wood Dale, United States) e submetidos à craneotomia, na qual foram feitos 3 incisões. Em duas incisões foram fixados parafusos de relojoeiro. Na outra, a cânula foi posicionada no ventrículo lateral direito de acordo com as coordenadas: AP = - 0,7 mm; ML = - 1,5 mm; DV = - 4,0 mm (PAXINOS and WATSON, 2007). A cânula foi fixada aos parafusos e a superfície do crânio com resina acrílica auto-polimerizante (Dental Vipi Flash, SP, Brasil). Para evitar o entupimento da cânula, foi colocado na extremidade externa mandril de polietileno com fio de aço de tamanho correspondente ao comprimento de cada cânula. O correto posicionamento da cânula guia no ventrículo lateral foi verificado pela queda na coluna de líquido dentro da pipeta (ANTUNES-RODRIGUES and McCANN, 1970; PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010). Todos os animais recuperaram o peso corporal durante pelo menos uma semana antes de serem submetidas ao protocolo experimental.

5.1.5 Canulação arterial

Para o registro da pressão arterial pulsátil foi implantado um cateter na aorta ascendente via artéria carótida esquerda (figura 6A). O cateter utilizado foi confeccionado com tubos de polietileno de diâmetros (PE50 e PE10; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e comprimentos diferentes (7 e 2,5 cm) soldados por aquecimento. O cateter foi preenchido com salina heparinizada, constituída de 0,1 mL de heparina sódica 25000UI (Liquemine®, Roche, RJ, Brasil) em 20 mL de salina e, para evitar obstrução da sua luz, uma

de suas extremidades foi ocluída com um pino de aço. Após a depilação da região do pescoço foi feita uma incisão de aproximadamente 0,7 cm neste local, possibilitando o acesso à artéria carótida esquerda. Foi feita uma incisão na artéria e o cateter foi inserido na aorta ascendente (3 cm a partir da incisão). Após a depilação da região cervical dorsal do animal o cateter foi exteriorizado na região cervical e fixado à pele por meio de um fio de sutura, permitindo livre movimentação do animal (figura 6B) (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010). O cateter foi lavado e preenchido diariamente com salina heparinizada. Foram dados dois dias de recuperação desta cirurgia antes de submeter os ratos ao protocolo experimental (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010).

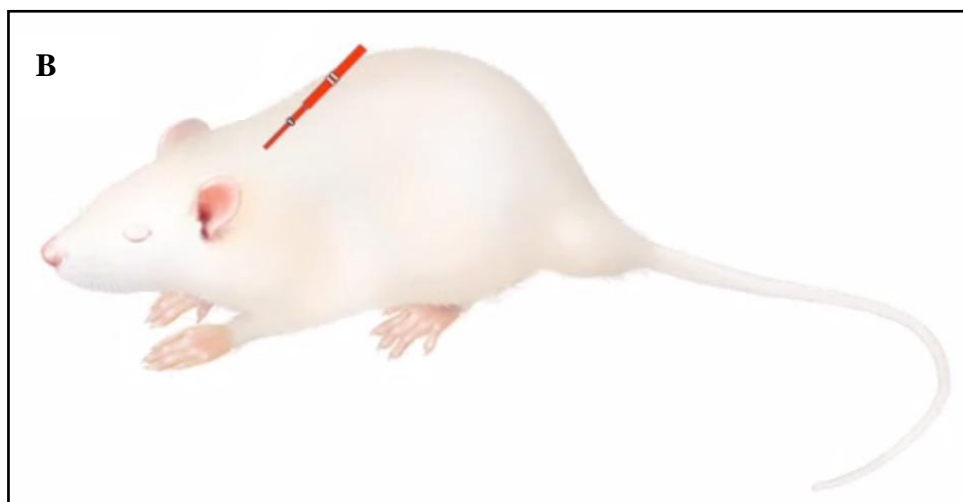
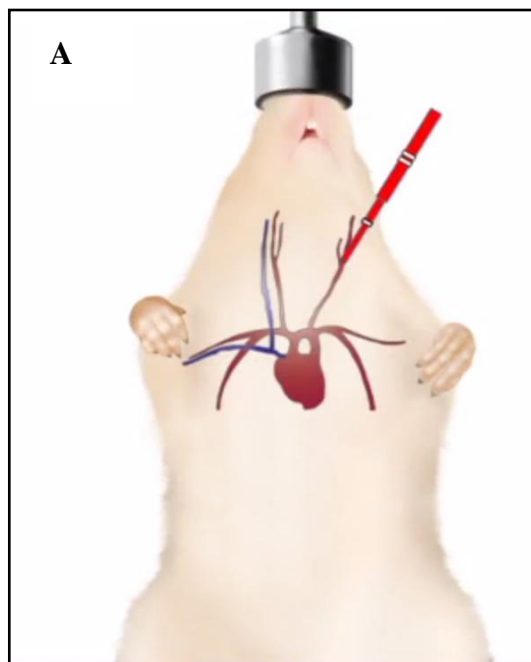


Figura 6. Representação esquemática da canulação arterial. A: Cateter implantado na aorta ascendente via artéria carótida esquerda. B: Exteriorização do cateter na região dorsal.

5.1.6 Injeção no ventrículo cerebral lateral direito

A estimulação colinérgica central foi realizada por meio da injeção de 2 μL de solução de fisostigmina ($10 \times 10^{-3} \text{ M}$ - Grupo Fis) (Sigma, St. Louis, EUA). Essa concentração de fis foi anteriormente descrita como capaz de induzir influência significativa nos parâmetros cardiovasculares e termorreguladores durante repouso e exercício (PIRES *et al.*, 2010). O mesmo volume de NaCl (0,15 M - Grupo Sal) foi injetado durante a situação controle. Utilizou-se seringa de 5 μL (Hamilton Company, Nevada, EUA) conectada com PE10 (CPL Medicals, SP, Brasil) a uma agulha injetora com 16,3 mm de comprimento. A injeção foi realizada durante 2 minutos para evitar o aumento da pressão hidrostática.

Os ratos foram submetidos às condições experimentais fis e sal com um intervalo de 48 horas entre os experimentos (PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007) de forma aleatorizada e balanceada. Os ratos utilizados no grupo exercício foram diferentes dos ratos utilizados no grupo repouso. A figura abaixo mostra a sequência metodológica dos procedimentos para todos os experimentos (figura 7).

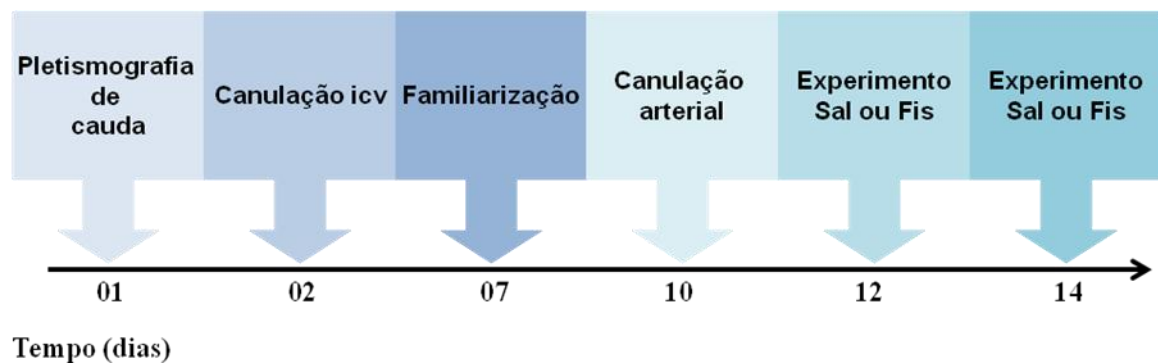


Figura 7. Sequência metodológica dos experimentos.

4.1.7 Controle de temperatura

A temperatura ambiente próxima aos animais (dentro da esteira e caixas) foi monitorada e mantida a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante todos os procedimentos experimentais.

6 ESTUDO 1

Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das respostas cardiovasculares, termorregulatórias e taxa metabólica durante o repouso em ratos SHR.

6.1 Experimento 1: Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das respostas cardiovasculares e termorregulatórias durante o repouso em ratos SHR.

6.1.1 Animais

Para a realização deste experimento foram usados ratos Wistar machos (peso = $327,22 \pm 26,55$ g; PAS = $131,99 \pm 2,41$ mmHg; n = 9) e SHR machos (peso = $243,89 \pm 5,26$ g; PAS = $181,95 \pm 4,37$ mmHg; n = 9).

6.1.2 Familiarização com sensores de temperatura

Após recuperação da estereotaxia, os animais foram familiarizados ao uso dos sensores de temperatura da pele da cauda e temperatura do cólon por 5 minutos durante três dias consecutivos.

6.1.3 Protocolo experimental

Após 60 minutos de repouso em gaiolas de polipropileno de dimensões 27,4 x 16,6 x 12,5cm, os animais receberam injeções aleatórias no ventrículo lateral direito de sal ou fis e permaneceram por mais 60 minutos dentro da caixa para a medida dos parâmetros termorregulatórios.

6.1.4 Temperatura corporal interna

A temperatura colônica (T_{int}) (°C) foi tomada como índice de temperatura corporal interna e foi mensurada com teletermômetro (Yellow Springs Instruments 4600, Ohio, USA) e uma sonda térmica. Os sedimentos fecais foram removidos a partir do cólon usando

massagem externa suave e um termistor foi lubrificado e inserido 6 cm após o esfíncter anal e preso à cauda (RODRIGUES *et al.*, 2008).

6.1.5 Temperatura da cauda

A temperatura da pele da cauda foi medida por meio de um sensor de temperatura (Eval Flex M8, Ellab, Hilleroed, Denmark) acoplado a um mostrador digital. O sensor foi posicionado na porção lateral a aproximadamente 2 cm da base da cauda utilizando-se um esparadrapo impermeável (CAMPOS *et al.*, 2014b; PIRES *et al.*, 2010; YOUNG and DAWSON, 1982). De acordo com Young e Dawson (1982) esta seria a melhor posição para o sensor, uma vez que a sensibilidade da medida da temperatura da pele da cauda às alterações do fluxo sanguíneo é maior neste local e o retorno venoso a partir da cauda, quando os vasos estão dilatados, é realizado principalmente pelas veias laterais. A T_{cauda} foi considerada como índice do tônus vasomotor da cauda, ou seja, a magnitude da vasodilatação cutânea foi refletida pela T_{cauda} (CAMPOS *et al.*, 2014b; LEITE *et al.*, 2012; PIRES *et al.*, 2007; SHELLOCK and RUBIN, 1984b).

6.1.6 Pressão arterial e frequência cardíaca

A FC e PAS foram derivadas a partir da pressão arterial pulsátil medida continuamente por meio de cateter implantado na artéria carótida e conectado ao transdutor de pressão que, por sua vez, foi conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Spain). O transdutor de pressão foi calibrado semanalmente e foi posicionado ao lado da caixa, na altura do coração do rato. As variáveis cardiovasculares foram calculadas via software (LabChart reader v8.1.5, ADInstruments, Spain) (figura 8).

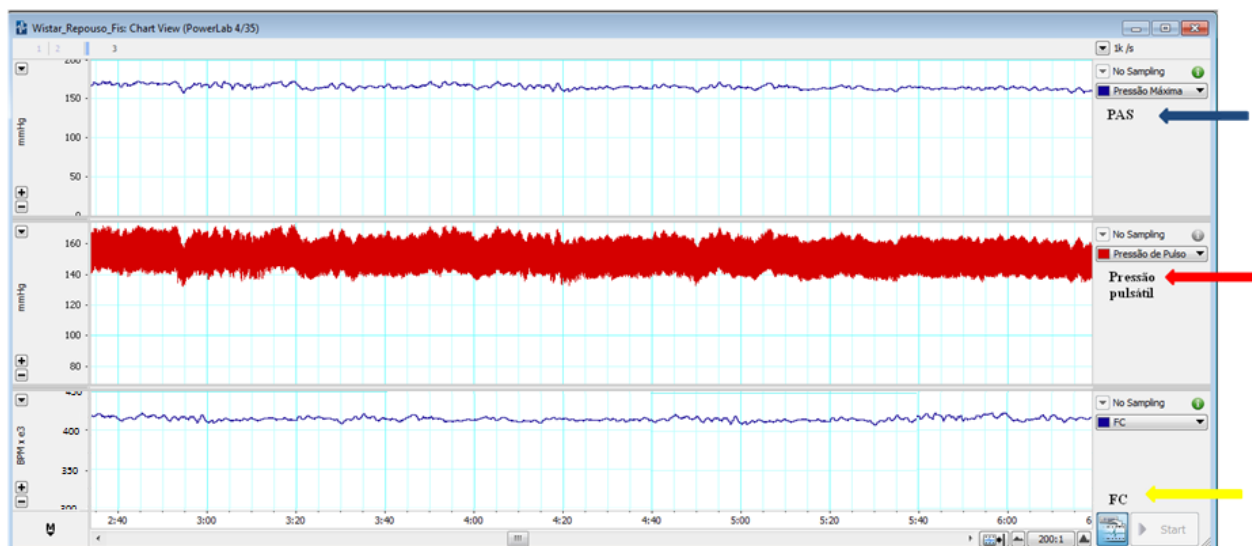


Figura 8. Registro da pressão arterial pulsátil de um rato Wistar durante o repouso após receber injeção icv de fisostigmina. Software LabChart reader v8.1.5, ADInstruments, Spain. A seta vermelha indica o registro da pressão pulsátil. A seta azul indica o registro da pressão arterial sistólica (PAS) derivada a partir da pressão pulsátil e a seta amarela indica o registro da frequência cardíaca derivada a partir da pressão pulsátil.

A pressão arterial pulsátil foi amostrada em uma taxa fixada em 2 kHz. Em seguida, os dados foram exportados para o programa Microsoft Excel, onde a função média aritmética foi aplicada a cada intervalo de 1 minuto.

6.1.7 Variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca

Análises no domínio da frequência foram realizadas durante os 15 primeiros minutos do repouso após injeção icv de fisostigmina (período de principal efeito da fisostigmina).

Para isso, os valores espúrios foram excluídos. Foram considerados valores espúrios os valores de PAS e FC maiores do que a média, acrescidos de dois desvios padrão (PIRES, 2012). Estes valores foram detectados e substituídos pela média do trecho analisado (trecho de 15 minutos após injeções icv). Na sequência, foram gerados arquivos no formato .txt. Em seguida, esses arquivos foram lidos em software específico (Cardioseries, v.2.4, São Paulo, SP, Brasil) que originou os valores da densidade espectral dos componentes espectrais da FC e PAS no domínio da frequência (figura 9).

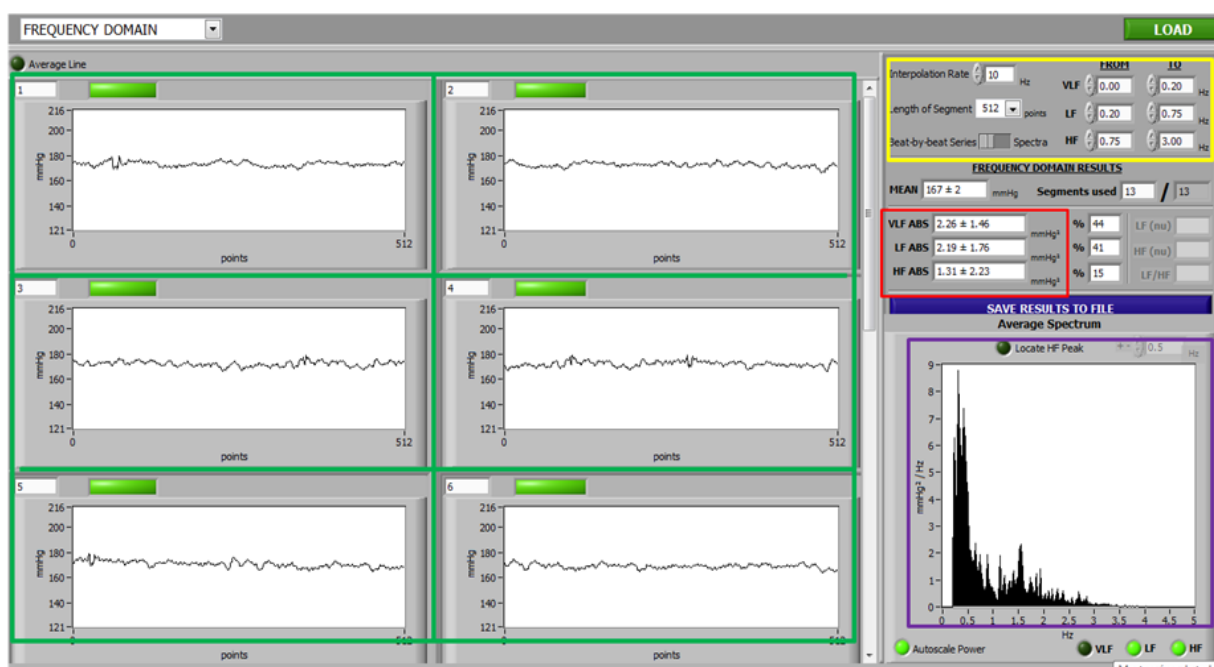


Figura 9. Pannel do domínio da frequência do software Cardioseries. O pannel do programa exhibe no canto superior direito (em amarelo), as taxas de interpolação e o tamanho do segmento. Logo abaixo, em vermelho são exibidas as larguras de bandas de muito baixa frequência (VLF), baixa frequência (LF) e alta frequência (HF). Em verde nos painéis numerados de 1 a 6, estão representados os parâmetros da variabilidade no domínio da frequência em segmentos de 512 pontos (o trecho analisado é dividido em subtrechos de 512 pontos). E no canto inferior direito, o programa exhibe o gráfico da densidade espectral calculada como a média da densidade dos seis segmentos analisados. Os dados exibidos correspondem à análise da variabilidade dos componentes espectrais da pressão arterial sistólica de um rato Wistar durante o repouso após receber injeção icv de fisostigmina.

A transformada rápida de Fourier foi utilizada para obter a densidade espectral dos componentes espectrais da PAS e FC. O tamanho do segmento foi fixado em 512 pontos com 50% de sobreposição e os componentes espectrais, para as bandas de muito baixa frequência (LVF: 0.0195 – 0.25 Hz), baixa frequência (LF: 0.27 – 0.74 Hz) e alta frequência (HF: 0.76 – 5 Hz) foram avaliados (CERUTTI *et al.*, 1994; PIRES *et al.*, 2013).

6.2 Experimento 2: Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação da taxa metabólica durante o repouso em ratos SHR.

6.2.1 Animais

Foram usados para este experimento ratos Wistar machos (peso = $316,87 \pm 20,91$ g; PAS = $125,12 \pm 3,53$ mmHg; n = 8) e SHR machos (peso = $256,25 \pm 12,09$ g; PAS = $183,93 \pm 1,45$ mmHg; n = 8) com 16 semanas de idade.

6.2.2 Familiarização com as câmaras metabólicas

Os ratos foram acomodados e permaneceram individualmente na câmara metabólica 12h antes do experimento, onde tiveram livre acesso à água e ração.

6.2.3 Protocolo experimental

Após 60 minutos de repouso, os animais receberam injeções icv aleatórias no ventrículo lateral direito de sal ou fis e permaneceram por mais 60 minutos dentro da câmara para a medida da taxa metabólica de repouso no período após a injeção icv.

6.2.4 Taxa metabólica

A taxa metabólica de repouso foi medida por meio do consumo de oxigênio (VO_2) e produção de dióxido de carbono (VCO_2). As medidas foram realizadas por calorímetro indireto (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) acoplado a câmara metabólica (fluxo de ar = 1,0 L/min), local em que os ratos foram acomodados. O sistema foi calibrado semanalmente com uma mistura conhecida de gases (MELO *et al.*, 2016). O VO_2 e VCO_2 foram medidos continuamente por meio de sistema computadorizado (Metabolism, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha).

6.3 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Transformações log foram usadas para normalizar os dados de densidade espectral da FC. Para avaliar os efeitos da estimulação colinérgica central na densidade espectral da PA e FC, bem como os seus efeitos sobre as variáveis termorregulatórias e cardiovasculares durante os primeiros 15 minutos do repouso foi usado análise de variância (anova) *one-way*. Para avaliar os efeitos da estimulação colinérgica central sobre as variáveis termorregulatórias e cardiovasculares em função do tempo foi usado anova *two-way*. O *post-hoc* de *Bonferroni* foi usado para múltiplas comparações. As integradas áreas sob a curva (ASC) da T_{cauda} , PAS e FC foram calculadas pela regra trapezoidal. A correlação entre as variáveis foi avaliada usando o coeficiente de correlação de *Pearson* e análise de regressão linear simples foi realizada para predição das variáveis cardiovasculares e termorregulatórias. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ para todos os testes.

6.4 RESULTADOS

Conforme mostrado na Figura 10A, houve um maior aumento no delta (Δ) da PAS aos 2 minutos após a injeção de fis em ratos Wistar comparado ao controle salina. Este aumento do Δ PAS continuou até o minuto 13 (Wistar sal: $4,52 \pm 2,02$ vs Wistar fis: $32,25 \pm 5,44$ mm Hg, 2 minutos após a injeção icv, $p < 0,001$). O Δ FC diminuiu do 8º até o 13º minuto após injeção icv de fis em ratos Wistar (Wistar sal: $-8,72 \pm 15,41$ vs Wistar fis: $-82,37 \pm 4,72$ bpm, 8 minutos após injeção icv, $p < 0,01$) (Figura 10B). Além disso, houve aumento no ΔT_{cauda} entre o 9º e 24º minutos após a administração de fis (Wistar sal: $-0,48 \pm 0,42$ vs Wistar fis:

$1,95 \pm 0,74$ °C, 9 minutos após a injeção icv, $p < 0,05$) (Figura 10C). Não houve mudança no ΔT_{int} (Figura 10D) ou na taxa metabólica (figura 10E), após administração de fis nos ratos Wistar.

No grupo SHR, a Figura 10F mostra que houve aumento significativo no ΔPAS do 3° até o 11° minuto (SHR sal: $4,58 \pm 5,86$ vs SHR fis: $41,96 \pm 1,34$ bpm, 3 minutos após a injeção icv, $p < 0,001$). Essa mudança foi seguida por redução do ΔFC a partir do 6° minuto após a injeção fis até o 14° minuto de repouso (SHR sal: $59,85 \pm 29,06$ vs SHR fis: $-29,86 \pm 17,69$ bpm, 6 minutos após a injeção icv, $p < 0,05$) (Figura 10G). Após esta redução da FC, houve aumento acentuado no ΔT_{cauda} , que iniciou no 8° minuto e permaneceu até o 19° minuto (SHR sal: $-0,68 \pm 0,61$ vs SHR fis: $2,53 \pm 0,75$ °C, 8 minutos após a injeção icv , $p < 0,05$) (Figura 10H). Além disso, ΔT_{int} reduziu a partir do 13° minuto após injeção icv de fis em relação ao controle sal em ratos SHR, permanecendo reduzido até o 22° minuto de repouso (SHR sal: $0,17 \pm 0,13$ vs SHR fis: $-0,67 \pm 0,21$ °C, 13 minutos após a injeção icv, $p < 0,01$) (Figura 10I). A Figura 10J mostra que a administração central de fis não influenciou a taxa metabólica em ratos SHR.

Mudanças na PAS, PAM, FC, T_{cauda} e T_{int} foram avaliados em 3 momentos distintos, ou seja, imediatamente antes da injeção icv (pré-icv), no pico da resposta, que representa o momento em que fis produziu o maior efeito sobre os parâmetros fisiológicos e 60 minutos após a injeção icv, são apresentados na tabela 1. Os ratos SHR apresentaram valores de PAS mais elevados do que os ratos Wistar no momento pré-icv. No pico máximo, a ativação colinérgica central produziu elevação da PAS nos ratos Wistar e SHR no 5° e 3° minutos, respectivamente, quando comparados aos seus controles salina. Além disso, em comparação com o controle correspondente, esse aumento foi 10,52% maior no SHR fis do que no Wistar fis (figura 11A). No final do período de repouso, a PAS retornou aos valores pré-icv em ambos os grupos.

Similarmente, os ratos SHR apresentaram maiores valores de PAM do que os ratos Wistar no momento pré-icv. A ativação colinérgica central produziu aumento na PAM em ratos Wistar e SHR, que atingiu seu pico aos 6° e 4° minutos, respectivamente, em relação aos seus controles sal. No final do período de repouso, a PAM retornou aos valores pré-icv em ambos os grupos no momento 60 minutos.

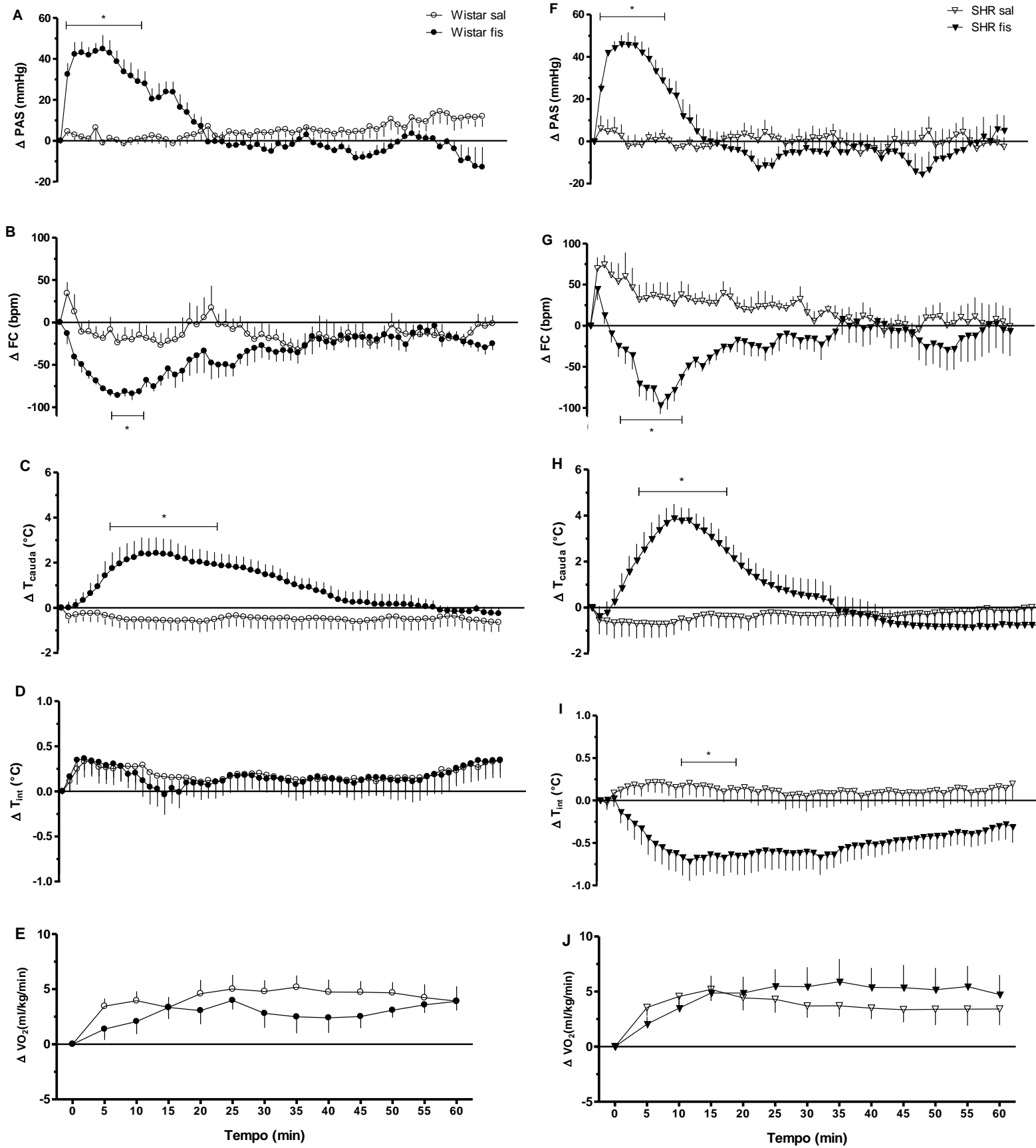


Figura 10. Delta (Δ) do perfil temporal das respostas termorregulatórias ($n = 9$), cardiovasculares ($n = 5$) e taxa metabólica ($n = 8$) de ratos Wistar e ratos SHR durante o repouso. A e F: Δ pressão arterial sistólica (PAS); B e

G: Δ frequência cardíaca (FC); C e H: Δ temperatura da cauda (T_{cauda}); D e I: Δ temperatura colônica (T_{int}); E e J: Δ taxa metabólica (VO_2). Valores são expressos como média \pm erro padrão (Anova *two-way*). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle salina.

Não houve diferença na FC entre os grupos no momento pré-icv. A ativação colinérgica central produziu uma redução significativa na FC somente no grupo SHR fis, que atingiu seu pico no 9º minuto em relação ao controle sal. No grupo Wistar fis, o pico máximo ocorreu aos sete minutos após a injeção icv. Em comparação com o controle correspondente, essa diminuição foi 23,43% maior no SHR fis do que no Wistar fis (figura 11C). Após 60 min, a FC retornou aos valores pré-icv em ambos os grupos.

A T_{cauda} no momento pré-icv não diferiu entre os grupos. No pico máximo de ação da fis, a T_{cauda} foi maior nos grupos Wistar fis e SHR fis em relação aos controles correspondentes tratados com sal. O pico máximo ocorreu no 13º e 11º minutos para os grupos Wistar fis e SHR fis, respectivamente. Em comparação com o controle correspondente, tal aumento foi 27,61% maior no SHR fis do que no Wistar fis (figura 11B). Aos 60 min, a T_{cauda} retornou aos valores pré-icv em ambos os grupos. No momento pré-icv, não houve diferença entre os grupos em relação a T_{int} . No entanto, houve uma diminuição na T_{int} no grupo SHR fis em relação ao seu controle sal no pico máximo de ação da fis que ocorreu aos 13 minutos após a injeção icv. No grupo Wistar fis, a resposta máxima foi observada aos 14 minutos após a injeção icv. No entanto, essa resposta não foi significativamente diferente do controle sal. Aos 60 min, a T_{int} retornou aos valores pré-icv em todos os grupos.

Tabela 1. Alterações temporais nas respostas cardiovasculares e termorregulatórias.

Condições	Wistar sal	Wistar fis	SHR sal	SHR fis	p1	Valor p p2	p3
PAS (mmHg)					0,001	<0,0001	0,0003
Pre-icv	135 ± 3	133 ± 6	175 ± 4 ^c	181 ± 8 ^d			
Pico máximo	134 ± 3	178 ± 9 ^a	178 ± 9 ^c	227 ± 5 ^{d,b}			
60 min	148 ± 5	121 ± 14	174 ± 5	164 ± 14 ^d			
PAM (mmHg)					0,005	<0,0001	0,0007
Pre-icv	128 ± 3	127 ± 6	158 ± 4 ^c	159 ± 9 ^d			
Pico máximo	127 ± 3	164 ± 7 ^a	163 ± 5 ^c	198 ± 6 ^{d,b}			
60 min	138 ± 6	113 ± 15	158 ± 4	163 ± 12 ^d			
FC (bpm·min⁻¹)					0,01	0,07	0,007
Pre-icv	427 ± 17	416 ± 16	375 ± 18	411 ± 27			
Pico máximo	403 ± 22	330 ± 14	409 ± 25	314 ± 14 ^b			
60 min	420 ± 20	389 ± 18	374 ± 18	409 ± 17			
T_{cauda}(°C)					<0,0001	<0,0001	<0,0001
Pre-icv	26,12 ± 0,58	26,69 ± 0,72	25,72 ± 0,89	26,06 ± 0,81			
Pico máximo	25,57 ± 0,48	29,11 ± 0,50 ^a	25,06 ± 0,37	29,94 ± 0,45 ^b			
60 min	25,47 ± 0,48	26,43 ± 0,85	25,74 ± 0,71	25,28 ± 0,60			
T_{int}(°C)					0,46	0,01	0,35
Pre-icv	37,48 ± 0,34	37,40 ± 0,21	37,90 ± 0,43	37,81 ± 0,26			
Pico máximo	37,65 ± 0,26	37,36 ± 0,31	38,10 ± 0,50	37,09 ± 0,30 ^b			
60 min	37,83 ± 0,25	37,74 ± 0,15	38,09 ± 0,40	37,50 ± 0,21			

Valores são apresentados como média ± erro padrão. p1: Interação entre grupos e tratamentos. p2: fator principal entre tratamentos; p3: fator principal entre grupos ^a P < 0,05: Wistar sal vs. Wistar fis; ^b P < 0,05: SHR sal vs. SHR fis; ^c P < 0,05: Wistar Sal vs. SHR Sal; ^d P < 0,05: Wistar fis vs. SHR fis; ^e P < 0,05: Wistar Sal vs. SHR fis; ^f P < 0,05: Wistar fis vs. SHR sal (*Anova two way*). Fis: fisostigmina; Sal: salina; SHR: *spontaneously hypertensive rats*; PAS: pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; T_{cauda}: temperatura da cauda; T_{int}: temperatura colônica; Pré icv: antes das injeções intracerebroventriculares; Pico máximo: maior efeito produzido pela fisostigmina durante os 15 primeiros minutos do repouso após injeção icv.

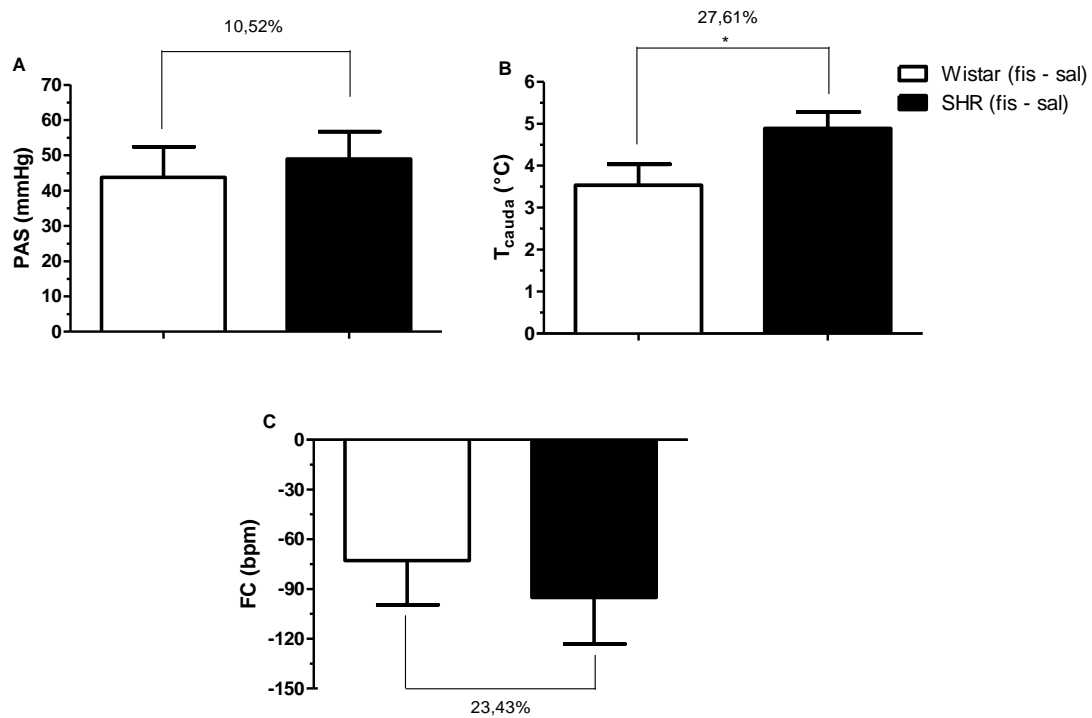


Figura 11. Magnitude das diferenças percentuais (%) entre Wistar fis e SHR fis em comparação com o controle correspondente. A: Pressão arterial sistólica (PAS); B: Temperatura da cauda (T_{cauda}) e C: Frequência cardíaca (FC). Fis: fisostigmina; Sal: Salina. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao Wistar (fis - sal).

Como mostrado na Figura 12A, os componentes VLF e LF da PAS que indicam atividade simpática vascular, foram significativamente maiores no SHR do que no genótipo Wistar. Após a estimulação colinérgica, estes componentes foram reduzidos no grupo SHR indicando redução da atividade simpática vascular no grupo SHR fis (componente VLF da PAS: SHR sal: $29,07 \pm 5,97 \text{ mmHg}^2$, SHR fis: $12,74 \pm 2,33 \text{ mmHg}^2$, $p < 0,01$ e componente LF da PAS: SHR Sal: $21,24 \pm 4,01 \text{ mmHg}^2$, SHR fis: $6,26 \pm 1,42 \text{ mmHg}^2$, $p < 0,001$). O componente HF da PAS que indica atividade simpática cardíaca e vascular também foi reduzida no grupo SHR após estimulação colinérgica central (SHR sal: $10,79 \pm 2,25 \text{ mmHg}^2$, SHR fis: $3,97 \pm 0,8 \text{ mmHg}^2$, $p < 0,001$). Além disso, o componente HF da PAS foi maior no SHR fis do que no Wistar fis.

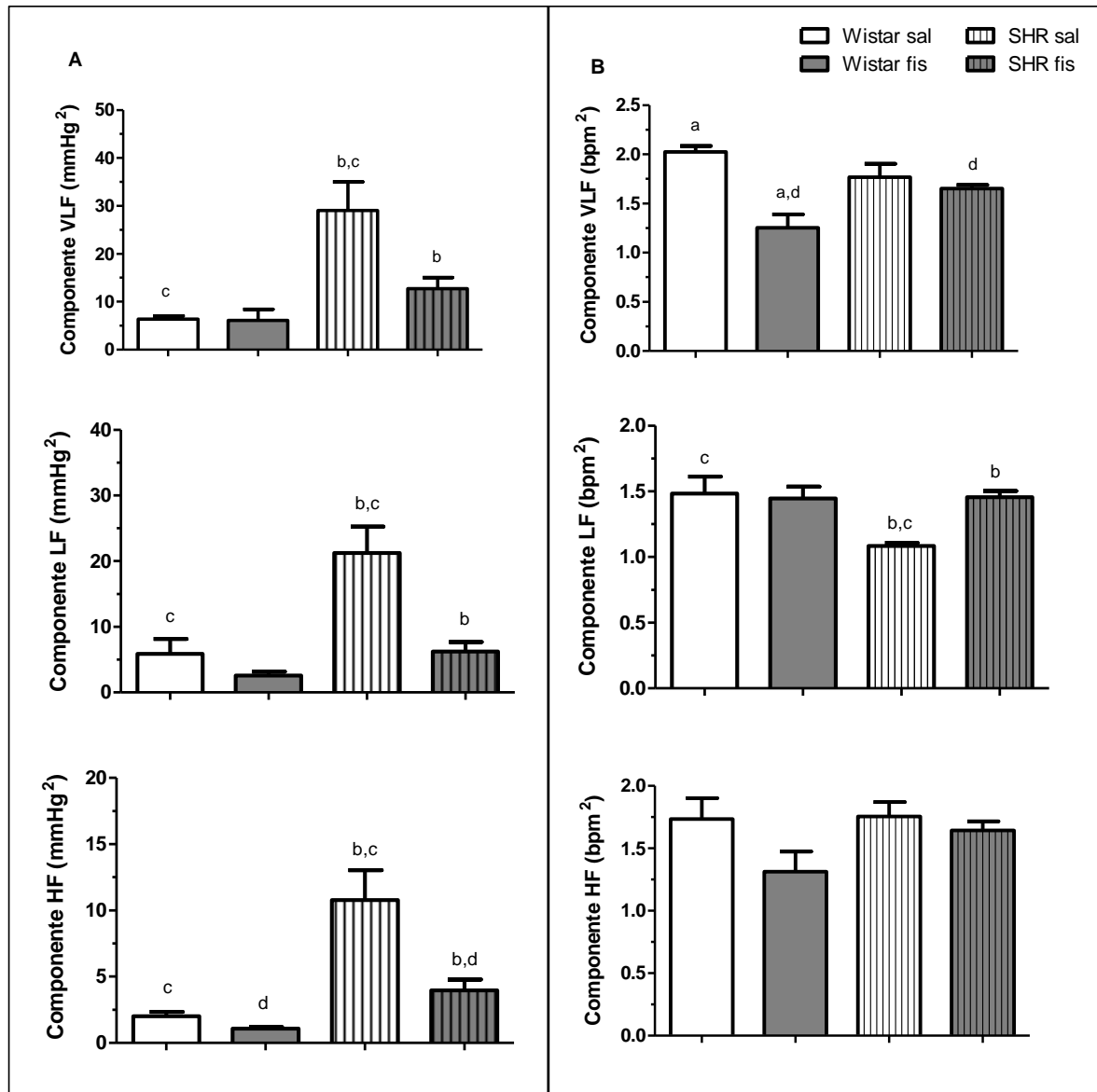


Figura 12. Efeitos da injeção intracerebroventricular de 2,0 µL de fisostigmina (fis) (10mM) ou 0,15 M NaCl (sal) sobre a densidade espectral da pressão sistólica e frequência cardíaca de ratos Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR) (n = 4 em cada grupo) durante os 15 primeiros minutos do repouso. A: Densidade espectral da pressão arterial sistólica. B: Densidade espectral da frequência cardíaca (dados são apresentados em logaritmo). VLF = muito baixa frequência; LF = baixa frequência; HF = alta frequência. Valores são expressos como média ± erro padrão. *Anova one-way*. ^aP < 0,05: Wistar sal vs. Wistar fis; ^bP < 0,05: SHR sal vs. SHR fis; ^cP < 0,05: Wistar sal vs. SHR sal; ^dP < 0,05: Wistar fis vs. SHR fis..

A figura 12B mostra que o componente VLF da FC que indica modulação autonômica mediada pelo barorreflexo foi menor no grupo Wistar fis comparado ao grupo Wistar sal (Wistar sal: $2,03 \pm 0,06 \text{ bpm}^2$; Wistar fis: $1,25 \pm 0,14 \text{ bpm}^2$; $p < 0,05$) e maior no grupo SHR fis comparado ao grupo Wistar fis (Wistar fis: $1,25 \pm 0,14 \text{ bpm}^2$, SHR fis: $1,65 \pm 0,04 \text{ bpm}^2$, $p < 0,05$). Além disso, o componente LF da FC que também indica modulação autonômica

mediada pelo barorreflexo foi significativamente menor no SHR sal comparado ao grupo Wistar sal (Wistar sal: $1,48 \pm 0,13 \text{ bpm}^2$, SHR sal: $1,08 \pm 0,02 \text{ bpm}^2$, $p < 0,05$). Após a estimulação colinérgica, o componente LF da FC foi maior no grupo SHR, indicando maior modulação autonômica mediada pelo barorreflexo (SHR sal: $1,08 \pm 0,02 \text{ bpm}^2$, SHR fis: $1,46 \pm 0,05 \text{ bpm}^2$, $p < 0,05$). Em contraste, não houve diferença significativa no componente HF para a variabilidade da FC (Figura 12B).

Houve correlação direta entre ΔT_{cauda} e o ΔPAS ($r = 0,71$, $p < 0,01$) (Figura 13A) e correlação inversa entre ΔT_{cauda} e ΔFC ($r = -0,71$; $p < 0,05$) (Figura 13B). Além disso, o ΔT_{cauda} foi inversamente correlacionado com o ΔT_{int} ($r = -0,86$; $p < 0,01$) (figura 13C) no grupo SHR (linha vermelha) durante os primeiros 15 minutos de repouso. Houve correlação inversa do componente LF da PAS com o ΔT_{cauda} ($r = -0,75$; $p < 0,05$) (figura 13D) e correlação direta entre o componente LF da FC e o ΔT_{cauda} ($r = 0,88$; $p < 0,01$) (Figura 13E) no grupo SHR (linha vermelha) durante os primeiros 15 minutos de repouso. Quando realizados para o grupo Wistar (linha azul), não houve correlações significativas entre as variáveis cardiovasculares e termorregulatórias: ΔT_{cauda} e ΔPAS ($p = 0,12$) (Figura 13A), ΔT_{cauda} e ΔFC ($p = 0,54$) (Figura 13B), ΔT_{cauda} com ΔT_{int} ($p = 0,87$) (Figura 13C), ΔT_{cauda} com o componente LF de PAS ($p = 0,43$) (Figura 13D) e ΔT_{cauda} com o componente LF da FC ($p = 0,64$) (Figura 13E) durante os primeiros 15 minutos de repouso. Deixando claro que a mudança na inclinação da reta no grupo SHR (linha vermelha) em relação ao grupo Wistar (linha azul), reforçando o efeito de fis nessas variáveis.

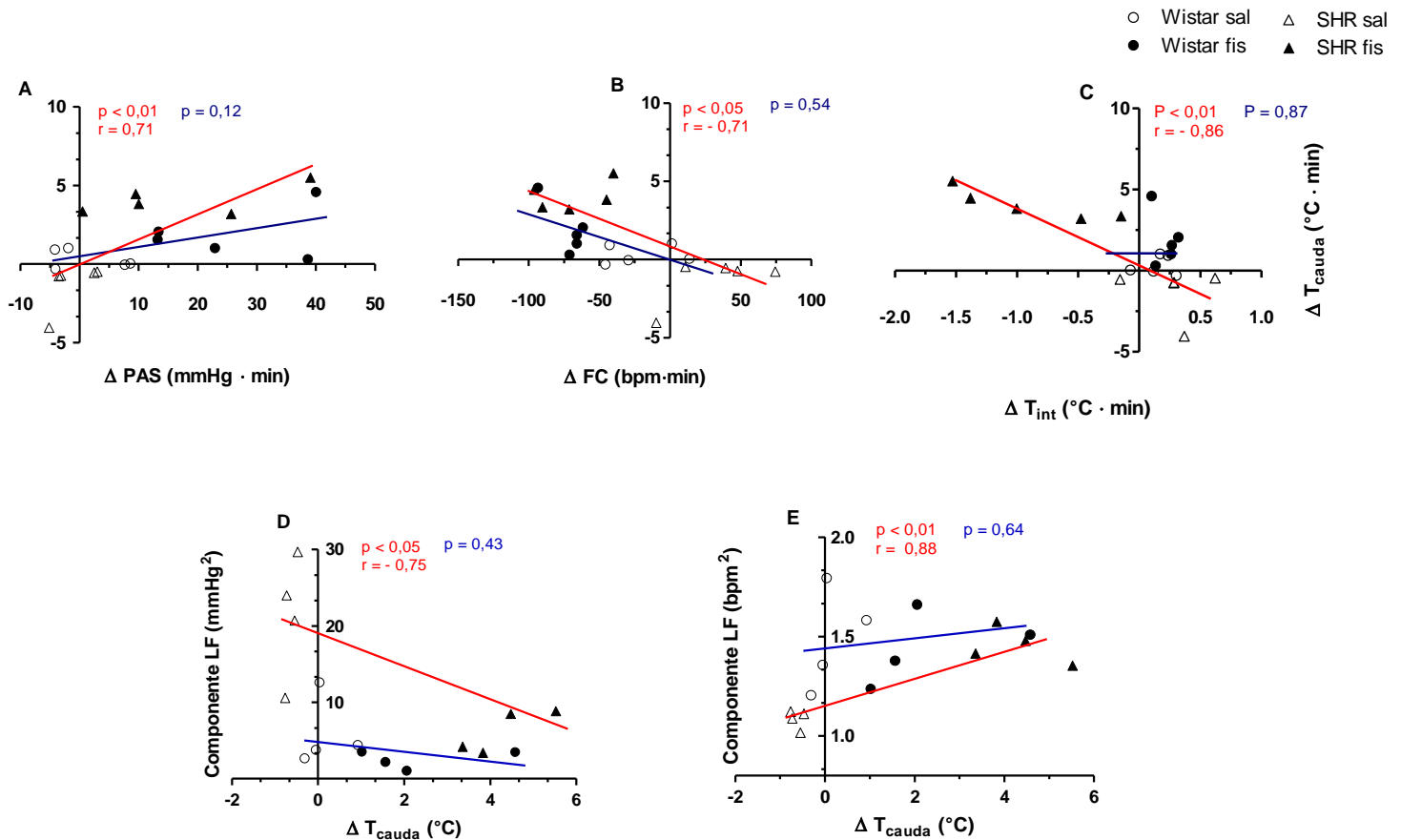


Figura 13. Correlação entre o delta (Δ) dos parâmetros cardiovasculares e termorregulatórios ($n = 5$ em cada grupo) durante os primeiros 15 minutos do repouso após injeções intracerebroventriculares de 2,0 μ L de fisostigmina (fis) (10mM) ou 0,15 M NaCl (sal). A: Δ pressão arterial sistólica (PAS), B: Δ frequência cardíaca (FC) e C: Δ temperatura colonica (T_{int}) com Δ temperatura da cauda (T_{cauda}); D: Componente baixa frequência (LF) da PAS e E: Componente baixa frequência (LF) da FC em ratos Wistar (linha azul) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (linha vermelha). Correlação de *Pearson*.

Com base nos efeitos da fis nos parâmetros cardiovasculares e termorreguladores observados na figura 10, bem como nas correlações observadas na figura 13, uma sequência de testes em pares foi realizada usando o modelo de regressão linear simples para o genótipo SHR. O aumento no Δ PAS parece explicar em 55,7% o aumento Δ T_{cauda} (Tabela 2). Assim, para cada aumento de 1 mm Hg no Δ PAS, haverá redução de 0,75 °C no Δ T_{cauda}. Além disso, a redução no Δ FC parece explicar cerca de 50,5% do aumento em Δ T_{cauda}, isto é, a redução em 1 bpm do Δ FC resulta em um aumento de 0,71 °C no Δ T_{cauda}. Adicionalmente, a redução do componente LF da PAS parec explicar 48,7% do aumento no Δ T_{cauda}, o que significa que a diminuição de 1 mm Hg² no componente LF resulta em aumento de 0,75 °C no Δ T_{cauda}. O aumento no componente LF da FC parece explicar 74,2% do aumento do Δ T_{cauda}. Assim, o

aumento de 1 bpm na densidade espectral do componente LF da FC resulta em um aumento de 0,83 °C no ΔT_{cauda} . Finalmente, a predição entre ΔT_{cauda} e o ΔT_{int} revelou que o aumento no ΔT_{cauda} parece explicar 74,7% da redução do ΔT_{int} . Em outras palavras, o aumento de 1 °C no ΔT_{cauda} resultará em redução de 0,86 °C no ΔT_{int} .

Tabela 2. Análise de regressão simples para predição das variáveis cardiovasculares e termorregulatórias em ratos SHR

Variável Independente	Variável Dependente	R ²	β	Valor p
Δ PAS	Δ T _{cauda}	0,557	0,75	0,01
Δ FC	Δ T _{cauda}	0,505	- 0,71	0,02
Componente LF (PAS)	Δ T _{cauda}	0,487	- 0,75	0,03
Componente LF (FC)	Δ T _{cauda}	0,742	0,83	0,004
Δ T _{cauda}	Δ T _{int}	0,747	- 0,86	0,001

β, coeficiente de regressão padronizado; R²: R² ajustado; PAS: pressão arterial sistólica; FC: frequência cardíaca; T_{cauda}: temperatura da cauda; Componente LF: componente de baixa frequência da PAS; Componente LF: componente de baixa frequência da FC; T_{int}: temperatura colônica.

Complementarmente, durante os primeiros 15 do repouso (momento em que a fisostigmina apresenta maior efeito nas variáveis estudadas) houve correlação direta e significativa entre a integrada área sob a curva (ASC) da temperatura da cauda com a ASC da PAS ($r = 0,54$; $p < 0,05$). Além disso, houve correlação inversa e significativa entre ASC temperatura da cauda com a ASC da FC ($r = -0,62$; $p < 0,01$) (figuras 14A e 14B respectivamente).

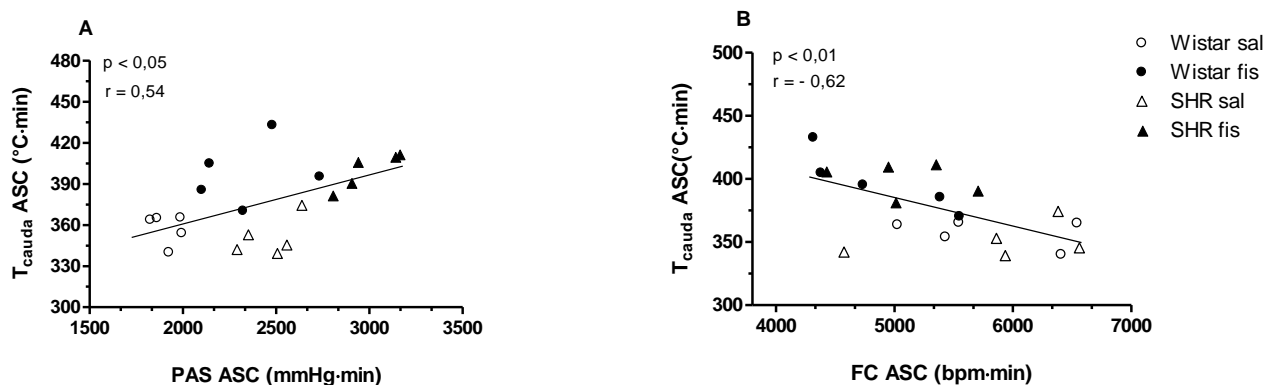


Figura 14. Correlação entre a integrada área sob a curva da pressão arterial sistólica (PAS ASC) (A) e a integrada área sob a curva da frequência cardíaca (FC SC) (B) com a integrada área sob a curva da temperatura da cauda (T_{cauda} ASC) durante os primeiros 15 minutos do repouso em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (n = 5 em cada grupo) após injeções intracerebroventricular de 2,0 µL de fisostigmina (fis) (10mM) ou 0,15 M NaCl (sal).

6.4 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi que as respostas cardiovasculares e termorregulatórias após a estimulação colinérgica central foram mais intensas nos ratos SHR do que nos ratos Wistar, sendo que a estimulação colinérgica central promoveu a perda de calor em ratos SHR, por aumento da T_{cauda} e posterior redução da T_{int}. Essas respostas foram temporariamente influenciadas por ajustes cardiovasculares, como mostrado pelo aumento rápido da PAS (3º minuto após injeção icv), acompanhado por diminuição da FC (6º minuto após injeção icv). Ambos os efeitos precederam e tiveram como consequência o aumento da T_{cauda} (8 minutos após injeção icv) e a diminuição da T_{int} (13 minutos após injeção icv). Além disso, as variáveis termorregulatórias e cardiovasculares foram fortemente correlacionadas. De fato, a análise de regressão linear entre os parâmetros cardiovasculares e termorregulatórios revelou uma considerável predição entre essas variáveis para o grupo SHR. Além disso, a estimulação colinérgica central reduziu a atividade simpática vascular e cardíaca e melhorou a resposta autonômica mediada pelo barorreflexo no SHR, sugerindo que a estimulação de vias colinérgicas centrais por fis modula respostas termorregulatórias por meio de mudanças no sistema cardiovascular em ratos SHR, possivelmente mediados pelo barorreflexo. Este é o primeiro estudo a demonstrar que ratos SHR apresentam respostas termorregulatórias e cardiovasculares mais intensas do que ratos normotensos após a estimulação colinérgica central. Além disso, essas respostas termorregulatórias são moduladas por meio de mudanças cardiovasculares.

A participação do sistema colinérgico central mediado por barorreceptores arteriais e, consequentemente, modulando a ativação de mecanismos de dissipação de calor cutânea foi evidenciada no estudo de Pires e colaboradores (2010). Nesse estudo, os ratos Wistar com denervação sino-aórtica tiveram a capacidade de perda de calor cutânea reduzida, mantendo a T_{int} inalterada, enquanto os ratos com denervação *sham* aumentaram a perda de calor cutânea e, consequentemente, reduziram a T_{int}. Uma vez que a literatura vigente demonstra que a ativação dos barorreceptores em repouso está ligada à maior saída vagal, bem como à retirada do sistema nervoso simpático (MICHELINI *et al.*, 2015), pode-se supor que a ativação do

sistema colinérgico central no grupo SHR influenciou a resposta pressórica e, consequentemente, a perda de calor por meio da vasodilatação da cauda. No presente estudo, ambos os grupos, Wistar fis e SHR fis apresentaram aumento da T_{cauda} ; entretanto, somente no grupo SHR fis houve redução significativa na T_{int} . A ativação da vasodilatação cutânea ocorreu com diferença de apenas 1 minuto entre os grupos, Wistar fis e SHR fis (7 minutos e 8 minutos após injeção icv, respectivamente (figuras 10C e 10H). Entretanto, a magnitude da vasodilatação cutânea, mensurada pelo aumento da T_{cauda} no SHR fis, foi 27,46% maior do que alcançado pelo Wistar fis no pico máximo de ação da fis (figura 11B). Logo, essa intensa resposta possivelmente contribuiu para a diminuição significativa da T_{int} observada no SHR fis, pois a produção de calor manteve-se semelhante entre os grupos (Figura 10J). Em adição, ambos os grupos apresentaram aumento da PAS, sendo que esta resposta foi 10,52% maior grupo no SHR fis do que Wistar fis (figura 11A). Além disso, a redução da FC foi 23,43% maior no SHR fis comparado ao Wistar fis (figura 11C). As variáveis cardiovasculares, possivelmente, predisseram ajustes termorregulatórios, conforme indicado pelo fato de que os dados da PAS e FC explicaram em 55,7% e 50,5%, respectivamente, do aumento de T_{cauda} . Além disso, o aumento na T_{cauda} parece explicar 74,7% da redução da T_{int} no SHR (Tabela 2). Em conjunto, esses dados sugerem que a resposta termorregulatória no SHR é mediada principalmente por reflexos não termorregulatórios. Além disso, a condição hipertensão arterial intensifica essa resposta.

De fato, a análise da variabilidade cardíaca mostrou que a densidade espectral da potência dos componentes da PAS foram maiores no SHR sal comparados à linhagem Wistar (figura 12A). Estes resultados eram esperados uma vez que os componentes avaliados indicam atividade simpática vascular (RADAELLI *et al.*, 2006; WAKI *et al.*, 2006) e atividade cardíaca simpática (YOSHIMOTO *et al.*, 2011) presentes na hipertensão experimental e clínica (ABBOUD, 1982; JUDY *et al.*, 1976). Entretanto, a estimulação colinérgica central foi capaz de promover a redução destes componentes (figura 12A). Ao encontro desses achados, estudos anteriores (CERUTTI *et al.*, 1994; JULIEN *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2013) observaram aumento da variabilidade da PAS em ratos com denervação sino-aórtica, sugerindo que o barorreflexo é importante sistema modulador das respostas autonômicas simpáticas cardíacas e vasculares. Adicionalmente, o componente LF da densidade espectral da PAS correlacionou fortemente com a T_{cauda} (figura 13D). A diminuição neste componente foi capaz de explicar em 48,7% o aumento na T_{cauda} , isto é, a diminuição de 1 mmHg² no componente LF promoveu o aumento de 0,75 °C na T_{cauda} (tabela 2). Dessa

forma, é razoável sugerir que tais componentes são adequados para inferir mudanças na atividade simpática vascular de ratos SHR após estimulação colinérgica central.

A injeção icv de fis promoveu atenuação da variabilidade da FC na banda VLF em ratos Wistar fis comparada à do seu controle salina, mas não teve efeito no genótipo SHR (figura 12B). VLF foi significativamente maior no SHR fis comparado ao Wistar fis (figura 12B). Os resultados do presente estudo também mostraram um aumento no componente LF da variabilidade da FC em SHR após estimulação colinérgica central e sem efeito no genótipo Wistar. Segundo (DWORKIN *et al.*, 2000) e GOLDSTEIN *et al.* (2001), os componentes VLF e LF indicam modulação autonômica mediada pelo barorreflexo. Reforçando esse conceito, estudos prévios (PIRES *et al.*, 2013; TANG and DWORKIN, 2009) observaram redução deste componente em ratos Wistar submetidos à denervação sino-aórtica. O componente LF da FC foi fortemente correlacionado com T_{cauda} (figura 13E). Além disso, o aumento deste componente foi capaz de explicar 74,2% do aumento da T_{cauda} . Assim, o aumento de 1 bpm² na banda LF resulta em aumento de 0,75°C na T_{cauda} (tabela 2). Todos estes achados parecem apoiar a hipótese de que a estimulação colinérgica central em ratos SHR melhora modulação autonômica mediada pelo barorreflexo.

Diante do acima exposto e considerando que: 1) existem evidências de que o tônus simpático vasoconstritor cutâneo é barossensitivo (JOHNSON and GILBEY, 1998; OWENS *et al.*, 2002; RATHNER *et al.*, 2008); 2) a estimulação de barorreceptores modula a perda de calor por meio da cauda (O'LEARY and JOHNSON, 1989; ZHANG *et al.*, 2003); 3) no presente estudo ratos SHR apresentaram melhor resposta autonômica mediada pelo barorreflexo e redução da atividade simpática vascular e cardíaca após estimulação colinérgica central; 4) tais respostas ocorreram paralelamente à redução da FC com consequente aumento da T_{cauda} e redução da T_{int} ; é procedente sugerir que a estimulação colinérgica central promove a perda de calor em ratos hipertensos primariamente por meio de mecanismos não termorregulatórios que podem ser mediados pelo barorreflexo.

Similarmente aos resultados do presente estudo, pesquisas anteriores mostraram uma maior resposta pressórica seguida de bradicardia reflexa após estimulação colinérgica central ou periférica com fis em ambos os genótipos Wistar e SHR, sendo a resposta mais pronunciada no SHR do que em ratos Wistar (BUCCAFUSCO *et al.*, 1990; KUBO and TATSUMI, 1979; LAZARTIGUES *et al.*, 1999). De acordo com Lazartigues e colaboradores (1999), fis atua por meio da estimulação de receptores muscarínicos M1 e M2, aumentando a pressão sanguínea mediada por aumento da vasopressina plasmática e do fluxo simpático. Lazartigues e colaboradores (1999) sugeriram que algumas modificações dos subtipos dos

receptores M1 em termos de expressão ou afinidade ou ambos poderiam ser responsáveis pela hiper-responsividade do SHR para fis. Além disso, a maior expressão do receptor M2, bem como mais locais de ligação para este receptor na RVLM do SHR do que no Wistar (GATTU *et al.*, 1997). Os níveis de acetiltransferase também foram relatados como sendo aumentados na RVLM do SHR, levando a maior liberação de acetilcolina (KUBO *et al.*, 1995). Juntos, esses mecanismos poderiam explicar a maior sensibilidade do SHR à estimulação colinérgica central, que provavelmente é responsável pela hiper-responsividade da pressão arterial observada no presente estudo.

A ativação do barorreflexo durante o aumento transiente da pressão arterial em repouso promove aumento da saída vagal e retirada do tônus simpático para o coração e vasos sanguíneos. Essa ativação é mediada por neurônios GABAérgicos que se projetam a partir da CVLM para neurônios simpáticos localizados na RVLM, levando à bradicardia (MICHELINI *et al.*, 2015). Essas hipóteses são consistentes com a hiper-responsividade da resposta pressórica seguida da bradicardia reflexa observada no presente estudo, que resultou em aumento da T_{cauda} e, consequente perda de calor no grupo SHR após estimulação colinérgica central.

Resultados prévios do nosso laboratório (FONSECA *et al.*, 2015) mostraram que indivíduos hipertensos apresentam maior dissipação de calor e, consequentemente, maior resfriamento corporal do que indivíduos normotensos durante repouso (fase de recuperação do exercício físico). Foi sugerido nesse estudo que os mecanismos termorregulatórios centrais parecem depender não só de sinapses colinérgicas, mas também da participação dos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos (GOTOH and SMYTHE, 1992; MYERS and YAKSH, 1969; RODRIGUES *et al.*, 2009; TAKAHASHI *et al.*, 1997) e dopaminérgicos (BALTHAZAR *et al.*, 2010; HASEGAWA *et al.*, 2000). Assim, o aumento da atividade colinérgica central resultante da própria hipertensão arterial poderia ter reduzido a atividade serotoninérgica central e esta, por sua vez, modulado a via dopaminérgica central, reduzindo o drive simpático adrenérgico para os vasos periféricos, favorecendo uma maior condução de calor para a periferia e maior dissipação de calor, especialmente em repouso (i.e., situação onde a estimulação simpática adrenérgica inerente ao exercício físico foi suprimida). Dessa forma, a via central envolvida no controle colinérgico dos sistemas termorregulatórios e cardiovascular, ainda precisa ser mais bem compreendida.

No presente estudo, apesar de apresentarem aumento na T_{cauda} , ratos Wistar não apresentaram redução da T_{int} após injeção icv de fis. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores (PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008;

RODRIGUES *et al.*, 2004) em que injeção icv de fis não alterou a T_{int} de ratos Wistar em repouso. Outros estudos observaram redução da T_{int} após estimulação central com fis (LIN *et al.*, 1980; PIRES *et al.*, 2010). Lin e colaboradores (1980) mostraram que a fis produz efeitos hipotérmicos por meio do aumento da T_{cauda} e diminuição na taxa metabólica. Entretanto, nossos resultados mostraram que a taxa metabólica não foi diferente entre as situações controle sal e fis durante o repouso (figura 10E), que é consistente com a ideia que o sistema colinérgico central parece influenciar principalmente os mecanismos de dissipação de calor (RODRIGUES *et al.*, 2004)

Em face das descobertas atuais, estudos futuros seriam úteis para entender melhor os efeitos da estimulação colinérgica central em situações de estresse, como durante o exercício físico, em que a estimulação simpática inerente do próprio exercício está presente. Além disso, o estresse resulta em competição entre as demandas termorregulatórias e metabólicas do exercício físico. A demanda cardiovascular na hipertensão também leva à competição cutânea e musculoesquelética para o débito cardíaco disponível.

6.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo mostraram que a estimulação colinérgica central em ratos SHR em repouso inicia uma sucessão de respostas cardiovasculares e termorregulatórias que resultam na redução da atividade simpática vascular e cardíaca, bem como melhora da modulação autonômica mediada pelo barorreflexo. Paralelamente, há um aumento na PAS, seguido por redução da FC, com consequente aumento da T_{cauda} melhorando a dissipação de calor. Embora tenham sido observadas respostas fisiológicas cardiovasculares e termorregulatórias semelhantes nos genótipos Wistar e SHR, a magnitude da ativação desses mecanismos parece ser maior no SHR, afetando a T_{int} . Juntos, esses resultados fornecem evidências de que ratos hipertensos apresentam respostas cardiovasculares e termorregulatórias mais intensas comparados à ratos normotensos após a estimulação colinérgica central.

7 ESTUDO 2

Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação das respostas cardiovasculares, termorregulatórias e taxa metabólica durante o exercício físico moderado até a fadiga em ratos SHR.

7.1 Experimento 3: Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central sobre os na modulação das respostas cardiovasculares e termorregulatórias durante o exercício físico moderado até a fadiga em ratos SHR.

7.1.1 Animais

Foram usados para este experimento ratos Wistar machos (peso = $310,0 \pm 17,37$ g; PAS = $128,70 \pm 4,23$ mmHg; n = 8) e SHR machos (peso = $248,12 \pm 6,47$ g; PAS = $172,51 \pm 4,44$ mmHg; n = 8).

7.1.2 Familiarização com atividade física

Após recuperação da estereotaxia, os animais foram familiarizados ao exercício em esteira (Panlab, Havard Apparatus, Espanha) durante três dias (5 min/dia; 5% de inclinação; 18m/min; estímulo elétrico de acordo com o limiar do animal). O limiar de estimulação elétrica foi determinado de acordo com a tolerância de cada animal, a ponto de causar um desconforto, sem causar dor, que o fizesse escolher permanecer na esteira ao invés da grade de estimulação elétrica (CAMPOS *et al.*, 2014b; LEITE *et al.*, 2012). Este exercício preliminar não constituiu treinamento, mas destinou-se a ensinar qual a direção que eles deveriam correr (CAMPOS *et al.*, 2014b; PIRES *et al.*, 2010; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007).

7.1.3 Protocolo experimental

Após 30 minutos de repouso dentro da esteira (Panlab, Havard Apparatus, Espanha), os ratos receberam injeções icv aleatórias de fis ou sal no ventrículo lateral direito. Imediatamente, os animais foram submetidos ao exercício com a velocidade da esteira mantida em 18 m/min e 5% de inclinação, que corresponde a intensidade de ~65% para ratos

não treinados (PIRES *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2004a). A corrida foi realizada até a fadiga, definida como o ponto no qual os animais não foram mais capazes de continuar o exercício, permanecendo sobre a grade de estímulo elétrico por pelo menos 10 s (WANNER *et al.*, 2007).

7.1.4 Parâmetros termorregulatórios e cardiovasculares

A T_{int} , a T_{cauda} , PA e FC foram medidas conforme descrito previamente para o estudo 1.

7.1.5 Tempo total de exercício

O tempo total do exercício até a fadiga foi determinado como o tempo entre o início do exercício até o momento da fadiga.

7.2 Experimento 4: Verificar o envolvimento do sistema colinérgico central na modulação da taxa metabólica durante o exercício físico moderado até a fadiga em ratos SHR.

7.2.1 Animais

Foram usados para este experimento ratos Wistar machos (peso = $321,25 \pm 13,11$ g; PAS = $127,10 \pm 2,92$ mmHg; n = 8) e SHR machos (peso = $248,13 \pm 4,81$ g; PAS = $177,37 \pm 3,37$ mmHg; n = 8) com 16 semanas de idade.

7.2.2 Familiarização com atividade física

Após recuperação da estereotaxia, foi iniciada a familiarização com a atividade física como descrita anteriormente no tópico 6.1.2.

7.2.3 Protocolo experimental

Após 30 minutos de repouso dentro da esteira (Panlab, Havard Apparatus, Espanha), os ratos receberam injeções aleatórias de fis ou sal no ventrículo lateral direito. Imediatamente, os animais foram submetidos ao exercício com a velocidade da esteira

mantida em 18 m/min e 5% de inclinação, que corresponde a intensidade de ~65% para ratos não treinados (PIRES *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2004a). A corrida foi realizada até a fadiga.

7.2.4 Taxa metabólica

A taxa metabólica durante o exercício foi medida por meio do VO_2 e VCO_2 . O sistema utilizado foi descrito previamente. As medidas foram realizadas por calorímetro indireto (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) acoplado a esteira (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) (fluxo de ar = 1,0 L/min).

7.3 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Para avaliar os efeitos da fis sobre o tempo de exercício foi usada anova *one-way* e para avaliar os efeitos da fis sobre as variáveis termorregulatórias, cardiovasculares e taxa metabólica em função do tempo foi usada anova *two-way*. O *post-hoc* de *Bonferroni* foi usado para múltiplas comparações. A correlação entre as variáveis foi avaliada pelo coeficiente de correlação de *Pearson* e análise de regressão linear simples foi realizada para predição das variáveis cardiovasculares e termorregulatórias. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ para todos os testes.

7.4 RESULTADOS

A figura 15 mostra as respostas cardiovasculares e termorregulatórias após injeção icv de fis comparado com a injeção icv de sal em ambos os grupos. Houve aumento significativo da PAS no terceiro minuto após injeção icv de fis em ratos Wistar comparado ao seu controle sal que permaneceu até o 9º minuto (Wistar sal: $152,95 \pm 3,83$ vs Wistar fis: $174,12 \pm 5,35$ mmHg, 3 minutos após injeção icv, $p < 0,05$) (figura 15A). Acompanhando esses resultados, houve redução da FC do quinto ao 7º minuto após injeção icv de fis em ratos Wistar (Wistar sal: $518,93 \pm 9,95$ vs Wistar fis: $454,03 \pm 16,16$ bpm, 5 minutos após injeção icv, $p < 0,05$) (figura 15B). Além disso, houve aumento da T_{cauda} entre os minutos 05 a 08 e os minutos 12 a 16, após a administração de fis (Wistar sal: $25,11 \pm 0,32$ vs Wistar fis $27,27 \pm 0,48$ °C, 05 minutos após injeção icv, $p < 0,05$) (figura 15C). Não houve diferença significativa entre o

grupo Wistar fis e o seu controle sal para a T_{int} (figura 15D). Entretanto, a análise do limiar para vasodilatação da cauda mostrou que fis diminuiu o limiar em aproximadamente $0,50^{\circ}\text{C}$ (Wistar sal: $38,79 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ vs Wistar fis: $38,30 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$; $p = 0,03$).

No grupo SHR, houve aumento na PAS após injeção icv de fis a partir do quinto até o 9º minuto comparado ao seu controle sal (SHR sal: $181,07 \pm 4,36$ vs SHR fis: $209,20 \pm 6,62$ bpm, 5 minutos após injeção icv, $p < 0,05$) (figura 15E). A FC reduziu no 6º e 7º minutos após injeção icv de fis (SHR sal: $506,62 \pm 5,17$ vs SHR fis: $457,31 \pm 7,24$ bpm, 6 minutos após injeção icv de fis, $p < 0,05$) (figura 15F). Os resultados não foram acompanhados por mudança na T_{cauda} (figura 15G). Não houve mudança na T_{int} entre os tratamentos o fis e sal para o grupo SHR (figura 15H).

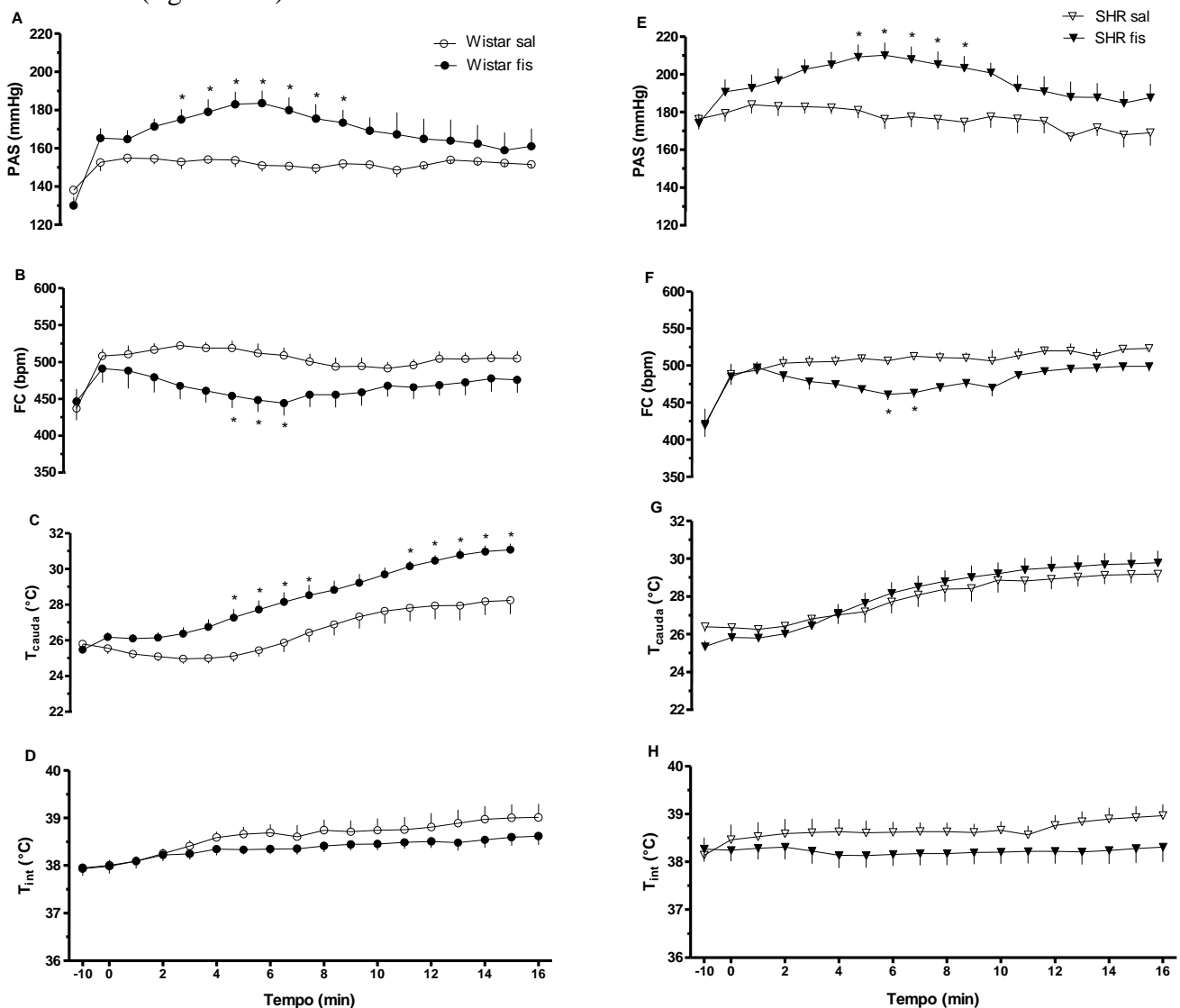


Figura 15. Perfil temporal das respostas termorregulatórias ($n = 8$ em cada grupo) e cardiovasculares ($n = 5$ em cada grupo) de ratos Wistar e ratos SHR durante o exercício físico. A e E: pressão arterial sistólica (PAS); B e F: frequência cardíaca (FC); C e G: temperatura da cauda (T_{cauda}); D e H: temperatura colônica (T_{int}). Valores são expressos como média \pm erro padrão (Anova *two-way*). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo controle salina.

A figura 16 mostra que não houve diferença na taxa metabólica entre os tratamentos sal e fis para ambos os genótipos (Wistar e SHR).

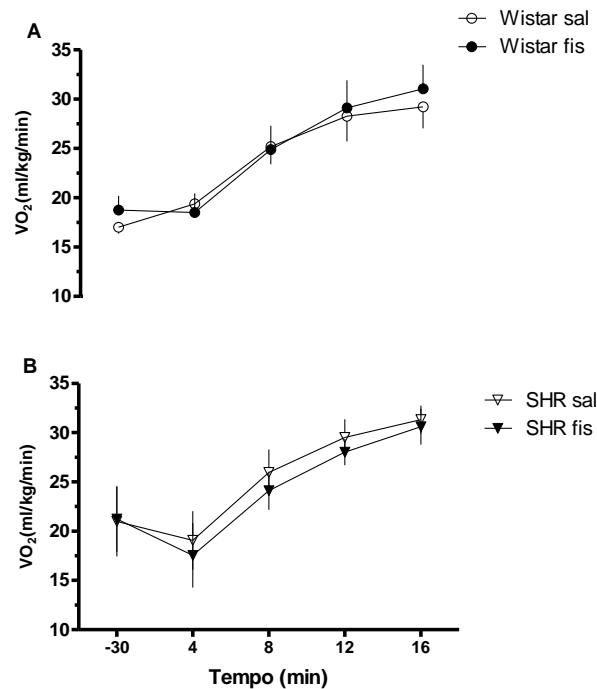


Figura 16. Perfil temporal do consumo de oxigênio de ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) durante o exercício físico até a fadiga. A e B: consumo de oxigênio (VO₂). N = 8 em cada grupo. Valores são apresentados em média \pm erro padrão. (Anova *two-way*).

A tabela 3 mostra as alterações na PAS, na PAM, na FC, na T_{cauda} e na T_{int} em três momentos distintos: momento pré-icv (que corresponde ao momento imediatamente antes da injeção icv de fis), no pico máximo da resposta, que representou o momento em que a fis produziu maior efeito nas variáveis estudadas e no momento da fadiga.

Para a PAS, os ratos SHR apresentaram maiores valores pressóricos comparados aos ratos Wistar no momento pré-icv. No pico máximo, a ativação colinérgica central produziu elevação da PAS nos ratos Wistar e SHR comparados aos seus controles salina, sendo que no grupo Wistar fis o aumento observado comparado ao seu controle salina foi 7,22% maior do que o observado no grupo SHR fis comparado ao SHR sal (figura 17A). No momento da fadiga, a PAS retornou para os valores pré-icv.

A PAM apresentou comportamento similar a PAS. Os ratos SHR apresentaram maiores valores pressóricos no momento pré-icv. No pico máximo, fis produziu elevação da

PAM em ambos os grupos (Wistar e SHR) comparados aos seus controles salina. No momento da fadiga, a PAM retornou para valores próximos ao momento pré-icv.

Tabela 3. Alterações temporais nas respostas cardiovasculares e termorregulatórias.

Condições	Wistar sal	Wistar fis	SHR sal	SHR fis	Valor p		
					p1	p2	p3
PAS (mmHg)					<0,0001	<0,0001	<0,0001
Pre-icv	138,11 ± 2,81	130,00 ± 4,59	176,25 ± 5,41 ^c	174,10 ± 5,03 ^d			
Pico máximo	150,85 ± 3,45	184,63 ± 6,07 ^a	179,73 ± 5,10 ^c	211,08 ± 6,44 ^{d,b}			
Fadiga	151,51 ± 0,80	162,41 ± 6,11	177,77 ± 5,95 ^c	193,11 ± 5,85 ^d			
PAM (mmHg)					0,0004	<0,0001	<0,0001
Pre-icv	127,25 ± 2,50	121,83 ± 3,89	157,88 ± 3,79 ^c	155,24 ± 3,80 ^d			
Pico máximo	137,36 ± 2,37	167,76 ± 4,04 ^a	160,76 ± 4,54 ^c	185,19 ± 4,10 ^b			
Fadiga	138,71 ± 1,53	146,86 ± 4,48	156,42 ± 6,98 ^c	166,66 ± 5,07 ^d			
FC (bpm)					0,20	0,053	<0,0001
Pré-icv	437,00 ± 26,47	446,53 ± 25,41	419,32 ± 22,38	421,56 ± 17,57			
Pico máximo	510,09 ± 11,54	443,03 ± 16,80 ^a	497,48 ± 15,01	457,11 ± 8,30			
Fadiga	504,85 ± 9,78	463,73 ± 20,03	514,83 ± 6,12	482,38 ± 13,34			
T _{cauda} (°C)					0,009	0,0004	<0,0001
Pré-icv	25,79 ± 0,34	25,47 ± 0,32	26,39 ± 0,27	25,35 ± 0,32			
Pico máximo	28,23 ± 0,76	31,15 ± 0,30 ^a	29,17 ± 0,44	29,86 ± 0,62			
Fadiga	28,23 ± 0,98	31,07 ± 0,52 ^a	29,19 ± 1,29	30,54 ± 0,84			
T _{int} (°C)					0,21	0,64	0,0006
Pré-icv	37,93 ± 0,11	37,95 ± 0,17	38,14 ± 0,37	38,27 ± 0,26			
Fadiga	39,01 ± 0,29	38,62 ± 0,19	38,97 ± 0,23	38,31 ± 0,31			

Valores são apresentados como média ± erro padrão. p1: Interação entre grupos e tratamentos. p2: fator principal entre tratamentos; p3: fator principal entre grupos. ^a P < 0,05: Wistar sal vs. Wistar fis; ^b P < 0,05: SHR sal vs. SHR fis; ^c P < 0,05: Wistar Sal vs. SHR Sal; ^d P < 0,05: Wistar fis vs. SHR fis; ^e P < 0,05: Wistar Sal vs. SHR fis; ^f P < 0,05: Wistar fis vs. SHR sal (*Anova two way*). Fis: fisostigmina; Sal: salina; SHR: ratos espontaneamente hipertensos; PAS: pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; T_{cauda}: temperatura da cauda; T_{int}: temperatura colônica; Pré icv: antes das injeções

intracerebroventriculares; Pico máximo: maior efeito produzido pela fisostigmina durante o exercício após injeção icv; Fadiga: final do exercício.

Já para a FC, não houve diferença entre os grupos no momento pré-icv. Entretanto, a ativação colinérgica central produziu redução significativa da FC somente no grupo Wistar fis comparado ao seu controle salina no pico máximo. A redução observada no Wistar fis comparado ao seu controle salina foi 39,8% maior do que o observado no grupo SHR fis comparado ao SHR sal (figura 17C). No momento da fadiga, a FC retornou aos valores pré-icv em ambos os grupos.

A T_{cauda} no momento pré-icv não diferiu entre os grupos. Já no pico máximo, houve efeito da droga, ou seja, tanto no grupo Wistar fis quanto no SHR fis a T_{cauda} foi maior comparada aos controles tratados com salina, sendo que no grupo Wistar fis o aumento observado comparado ao seu controle salina foi 76,21% maior do que o observado no grupo SHR fis comparado ao grupo SHR sal (figura 17B). No momento da fadiga, o efeito da fis foi mantido no grupo Wistar.

Para a T_{int} , não houve diferença entre os grupos no momento pré-icv e fadiga. Devido à dificuldade para selecionar o momento de maior ação da fis em ambos os grupos, os dados não foram apresentados.

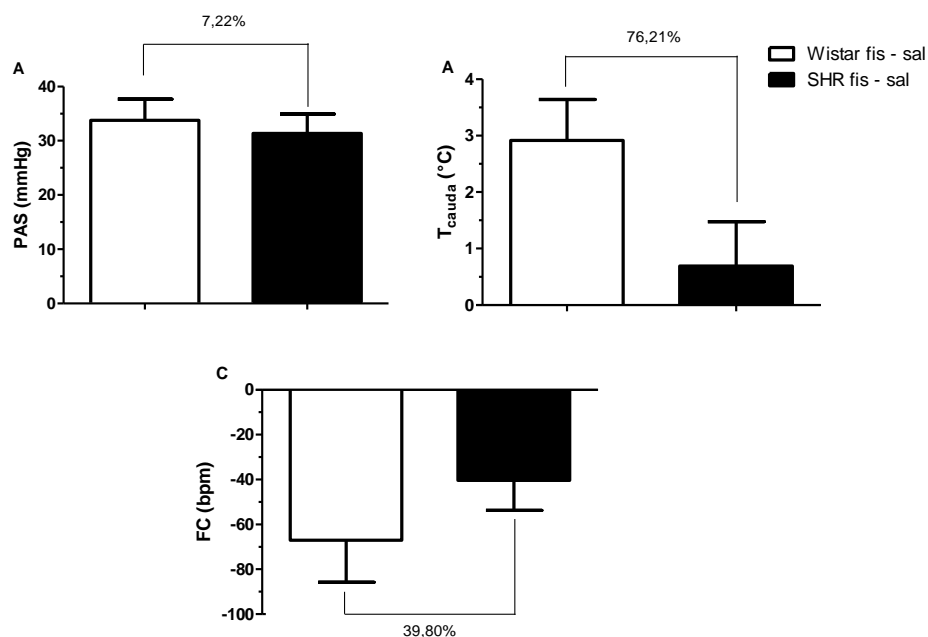


Figura 17. Magnitude das diferenças percentuais (%) entre Wistar fis e SHR fis em comparação com o controle

correspondente. A: Pressão arterial sistólica (PAS); B: Temperatura da cauda (T_{cauda}) e C: Frequência cardíaca (FC). Fis: fisostigmina; Sal: Salina. Valores são apresentados como média \pm erro padrão.

A figura 18A mostra que houve correlação direta entre a T_{cauda} e PAS ($r = 0,65$; $p < 0,05$) e correlação inversa e significativa entre T_{cauda} e FC ($r = -0,68$; $p < 0,05$) (figura 18B) no grupo Wistar (linha azul) durante o exercício. Quando realizada para o grupo SHR (linha vermelha), não houve correlação entre as variáveis cardiovasculares e termorregulatórias: T_{cauda} e PAS ($p = 0,67$) (Figura 18A) e T_{cauda} com FC ($p = 0,17$) (Figura 18B).

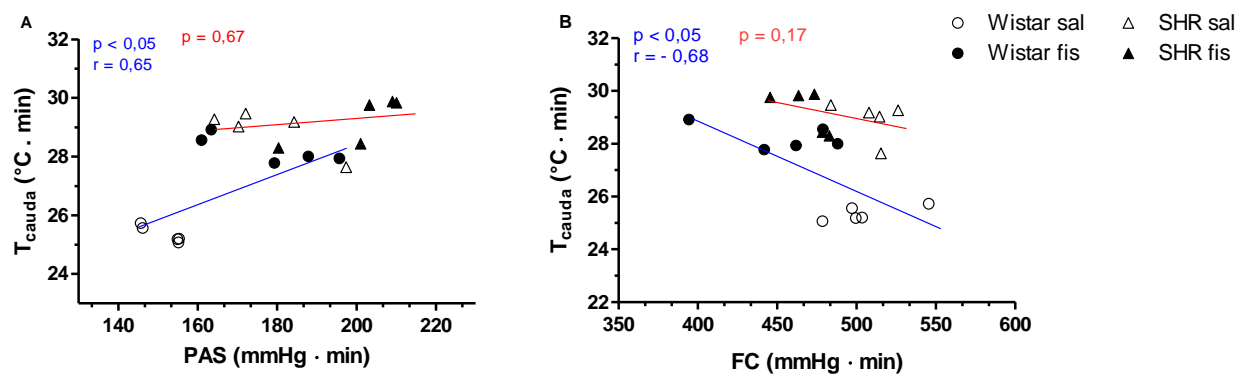


Figura 18. Correlação entre os parâmetros cardiovasculares e termorregulatórios ($n = 5$ em cada grupo) durante o exercício físico após injeções intracerebroventriculares de 2,0 μL de fisostigmina (fis) (10mM) ou 0,15 M NaCl (sal). A: pressão arterial sistólica (PAS), B: frequência cardíaca (FC) e com temperatura da cauda (T_{cauda}) em ratos Wistar (linha azul) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (linha vermelha). Correlação de *Pearson*.

Com base no efeito da fis sobre as respostas cardiovasculares e termorregulatórias no grupo Wistar observadas na figura 15, bem como a observação de correlação entre PAS e FC com T_{cauda} (figura 18), uma sequência de testes em pares foi realizada utilizando o modelo de regressão linear simples. Os resultados mostram que o aumento da PAS parece explicar 42,2% o aumento da T_{cauda} . Assim, para cada aumento de 1 mmHg da PAS, ocorrerá aumento de 0,65 $^{\circ}\text{C}$ da T_{cauda} . Além disso, a redução da FC parece explicar em torno de 46,8% no aumento da T_{cauda} , ou seja, a redução em 1 bpm da FC resulta em aumento de 0,68 $^{\circ}\text{C}$ na T_{cauda} (tabela 4).

Tabela 4. Análise de regressão linear simples para predição das variáveis cardiovasculares e termorregulatórias no grupo Wistar.

Variável Independente	Variável Dependente	R ²	B	Valor p
PAS	T _{cauda}	0,422	0,65	0,04
FC	T _{cauda}	0,468	- 0,68	0,03

β: Coeficiente de regressão padronizado; R²: R ajustado; PAS: pressão arterial sistólica; FC: frequência cardíaca; T_{cauda}: temperatura da cauda.

A figura 19A mostra que o tempo para a fadiga foi maior no grupo Wistar sal em relação ao grupo SHR sal (Wistar sal: $32,25 \pm 5,22$ vs SHR sal: $19,25 \pm 1,69$ minutos, $p < 0,01$). Houve diferença significativa entre Δ tempo total de exercício, no grupo Wistar (fis-sal) comparado ao grupo SHR (fis-sal) (figura 19B).

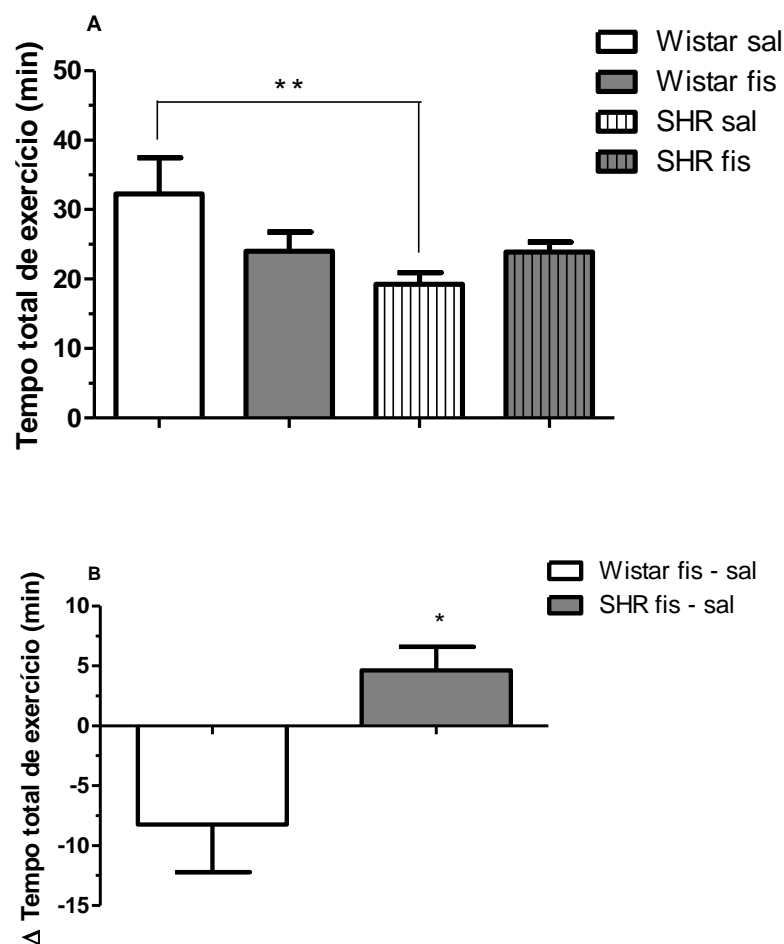


Figura 19. Tempo total de exercício (A) e Δ tempo total de exercício de ratos (B) de ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos ($n = 8$ em cada grupo). Valores são expressos como média \pm SEM. ** $p < 0,01$ Wistar sal vs SHR sal. (Anova One-Way). * $p < 0,02$ Wistar (fis - sal) vs SHR (fis-sal). (Test-t independente).

7.5 DISCUSSÃO

O presente estudo forneceu evidências de que a estimulação colinérgica via injeção icv de fis durante o exercício promove ajustes no sistema cardiovascular de ratos SHR e Wistar, sendo mais intensas em ratos Wistar. Em ratos hipertensos, essas alterações cardiovasculares não foram suficientes para ajustar as respostas termorregulatórias. Entretanto, a estimulação colinérgica central impactou positivamente no desempenho físico em modelo animal que mimetiza hipertensão arterial. Este foi o primeiro estudo a investigar os efeitos da estimulação colinérgica central via injeção icv de fis nos ajustes cardiovasculares e termorregulatórios de ratos SHR durante o exercício físico.

Estudos prévios (PIRES *et al.*, 2010) demonstraram que a estimulação colinérgica central modula a perda de calor durante o exercício por meio do aumento na pressão sanguínea, que por sua vez promove ativação do barorreflexo. No estudo de Pires e colaboradores (2010), ratos Wistar com denervação sino-aórtica tiveram aumento da pressão arterial, sem alterações na FC e redução da capacidade de perda de calor cutânea. Já os ratos com denervação *sham* aumentaram a pressão arterial, com consequente redução da FC e aumento da perda de calor cutânea. No presente estudo, ambos os grupos (Wistar fis e SHR fis) apresentaram aumento da PAS e, consequente redução da FC (figura 15). Entretanto, somente o grupo Wistar fis apresentou aumento da T_{cauda} , que foi 76,21% maior comparado ao grupo SHR (figure 17B). Além disso, a magnitude do aumento da PAS e FC no grupo Wistar fis comparado ao seu controle sal foram 7,22% e 39,80% respectivamente, maiores do que no grupo SHR fis comparado ao seu controle sal (figure 17A e 17C).

Nossa hipótese foi que a estimulação colinérgica central por fis atenuaria a hipertermia induzida pelo exercício via aumento da vasodilatação da cauda induzida por uma maior resposta pressórica no SHR (BUCCAFUSCO *et al.*, 1990; KUBO and TATSUMI, 1979), o que seria possível devido à maior sensibilidade à estimulação colinérgica central do SHR (LAZARTIGUES *et al.*, 1999), levando à maior bradicardia reflexa induzida, possivelmente pela ativação do barorreflexo. No entanto, fis não foi capaz de modular as respostas termorregulatórias de dissipação de calor em ratos SHR durante o exercício físico. Por outro lado, ajustes cardiovasculares foram induzidos por fis. Houve aumento da PAS a partir do 6º minuto após injeção icv de fis (figura 15E), seguido de redução da FC que iniciou a partir do 7º minuto após injeção icv de fis (figura 15F).

Resultados da situação repouso evidenciaram que a estimulação colinérgica central modula as respostas termorregulatórias durante o repouso por meio de ajustes no sistema

cardiovascular em ratos hipertensos. Houve melhora na resposta autonômica mediada pelos barorreceptores (evidenciada pela redução da variabilidade cardíaca da FC), redução da atividade simpática vascular e cardíaca (evidenciada pela redução da variabilidade cardíaca da PAS). Paralelamente, houve aumento da PAS, seguido de bradicardia reflexa com consequente aumento da T_{cauda} , resultando em dissipação de calor no SHR (redução da T_{int}). Além disso, as repostas cardiovasculares e termorregulatórias foram mais intensas no genótipo SHR comparado ao genótipo Wistar. Entretanto, no presente estudo, tais respostas termorregulatórias não foram observadas durante o exercício físico até a fadiga em ratos SHR.

Durante o exercício físico, a competição entre o controle termorregulatório, as demandas metabólicas do exercício físico e as demandas cardiovasculares da hipertensão também representam competição entre o fluxo sanguíneo cutâneo e a musculatura esquelética ativada pelo débito cardíaco disponível (JOHNSON, 2010). O sistema nervoso autônomo produz maior vasoconstrição e desvio do volume do fluxo sanguíneo visceral na tentativa de manter o débito cardíaco e o sangue necessário para o músculo e a pele simultaneamente. Como a hipertensão é caracterizada por maiores valores pressóricos para o mesmo esforço muscular (KENNEY *et al.*, 1984), esta impõe uma sobrecarga extra ao sistema cardiovascular durante o exercício agudo (SHERWOOD *et al.*, 1995), que pode dificultar o desvio do fluxo sanguíneo para a cauda, e, consequentemente o aumento da T_{cauda} , impedindo a dissipação de calor após estimulação colinérgica central. Assim, ao reduzir ou atrasar a dissipação de calor, ocorre uma menor concorrência pelo fluxo sanguíneo entre a pele e os músculos ativos durante o exercício, resultando em menor tensão cardiovascular.

No presente estudo, ratos Wistar apresentaram aumento da PAS, seguido de bradicardia reflexa, com consequente aumento da T_{cauda} após fis durante o exercício físico até a fadiga. Além disso, as variáveis cardiovasculares e termorregulatórias foram fortemente correlacionadas (figura 18) e a análise de regressão linear revelou considerável predição entre as variáveis (tabela 4). De fato, esses achados estão na direção de estudos prévios (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010) que mostraram que a estimulação colinérgica central promove modulação no sistema termorregulatório por meio de mudanças no sistema cardiovascular em ratos Wistar. Nestes estudos, fis foi capaz de atenuar a hipertermia induzida pelo exercício prevenindo o aumento da T_{int} (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009). No presente estudo, não houve diferença significativa para a T_{int} entre o grupo Wistar fis e seu controle sal. No entanto, a análise do limiar para vasodilatação da cauda mostrou que fis diminuiu o limiar em aproximadamente 0,50°C. Corroborando este resultado, Rodrigues e colaboradores (2009)

observaram redução de aproximadamente $0,43^{\circ}\text{C}$ no limiar para a vasodilatação da cauda após estimulação colinérgica central.

O grupo SHR sal apresentou menor tempo total de exercício comparado ao grupo Wistar sal (figura 19A). De fato, a hipertensão parece estar associada à intolerância ao exercício (DRUMMOND *et al.*, 2016; GUAZZI *et al.*, 2001). Sugeriu-se que o fator limitante da capacidade do exercício em ratos hipertensos poderia estar associado ao aumento exagerado da T_{int} . Além disso, a pressão elevada no SHR somado ao aumento adicional induzido pelo exercício pode proporcionar um desafio considerável na hipertensão sendo determinante para o desempenho físico. No entanto, os mecanismos pelos quais a hipertensão reduz o desempenho físico ainda precisam ser mais bem compreendidos.

Além disso, o tempo total de exercício não foi alterado entre as condições fis e sal no grupo Wistar (figura 19A), confirmando a hipótese de que fis parece não influenciar o desempenho físico como observado em estudos anteriores (DAMASCENO *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2004). Entretanto, a análise de delta revelou diferenças significativas no tempo total de exercício entre os grupos Wistar (fis – sal) *vs* SHR (fis – sal) (figura 19B). Assim, estes resultados confirmam a hipótese de que houve tentativa de modulação termorregulatória via mudanças do sistema cardiovascular buscando impactar no desempenho físico após estimulação colinérgica central em ratos hipertensos.

Nossos resultados mostraram que não houve diferença na taxa metabólica entre as condições sal e fis durante o exercício (figura 16), sugerindo que, em termos de balanço térmico, o sistema colinérgico central parece não influenciar os mecanismos de produção de calor (RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2004). Resultados da situação repouso corroboram a afirmativa anterior, uma vez que mostraram que a estimulação colinérgica central parece influenciar apenas os mecanismos de dissipação de calor, sem alterar a produção de calor em ratos SHR.

Com base nas evidências atuais, novos estudos são necessários para confirmar e entender melhor os efeitos da estimulação colinérgica central em situações de desafio pelo exercício físico em condições de hipertensão.

7.7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram o papel do sistema colinérgico central durante o exercício físico nos ajustes cardiovasculares de ratos SHR e

Wistar. Apesar das alterações no sistema cardiovascular não terem sido suficientes para ajustar as respostas termorregulatórias em ratos hipertensos, impactaram positivamente no desempenho físico.

8 CONCLUSÃO GERAL

A estimulação colinérgica central em repouso modula as repostas termorregulatórias por meio de mudanças no sistema cardiovascular de ratos Wistar e SHR, sendo que essas respostas são mais acentuadas em ratos hipertensos, impactando positivamente na dissipação de calor.

Durante o exercício físico, a estimulação colinérgica central promove alterações no sistema cardiovascular mais intensas e ajustadas com o sistema termorregulatório de ratos Wistar. Em ratos hipertensos, apesar destas alterações no sistema cardiovascular não terem sido suficientes para ajustar as respostas termorregulatórias, impactou positivamente no desempenho físico.

9 REFERÊNCIAS

ABBOUD, F. M. The sympathetic system in hypertension. State-of-the-art review. **Hypertension**, v. 4, n. 3 Pt 2, p. 208-25, May-Jun 1982.

ALDERDICE, M. T. Physostigmine, but not neostigmine, inhibits acetylcholine release. **Brain Res**, v. 178, n. 2-3, p. 596-9, Dec 14 1979.

AMENTA, F.; TAYEBATI, S. K. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 5, p. 488-98, 2008.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. Water, sodium chloride, and food intake induced by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricle of the rat brain. **Experimental Biology and Medicine**, v. 133, n. 4, p. 1464-1470, 1970.

AVELAR, N. C. et al. Oxygen consumption and heart rate during repeated squatting exercises with or without whole-body vibration in the elderly. **J Strength Cond Res**, v. 25, n. 12, p. 3495-500, Dec 2011.

AVELAR, N. C. et al. The effect of adding whole-body vibration to squat training on the functional performance and self-report of disease status in elderly patients with knee osteoarthritis: a randomized, controlled clinical study. **J Altern Complement Med**, v. 17, n. 12, p. 1149-55, Dec 2011.

BALTHAZAR, C. H. et al. Effects of blockade of central dopamine D1 and D2 receptors on thermoregulation, metabolic rate and running performance. **Pharmacol Rep**, v. 62, n. 1, p. 54-61, Jan-Feb 2010.

BLANCO, J. H. et al. Chronic cholinergic stimulation promotes changes in cardiovascular autonomic control in spontaneously hypertensive rats. **Auton Neurosci**, v. 193, p. 97-103, Dec 2015.

BRAZ, N. F. et al. Influence of aerobic training on cardiovascular and metabolic parameters in elderly hypertensive women. **Int J Prev Med**, v. 3, n. 9, p. 652-9, Sep 2012.

BRENNER, I. K.; THOMAS, S.; SHEPHARD, R. J. Autonomic regulation of the circulation during exercise and heat exposure. Inferences from heart rate variability. **Sports Med**, v. 26, n. 2, p. 85-99, Aug 1998.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 45, n. 6, p. 1009-1015, 1978.

BUCCAFUSCO, J.; SPECTOR, S. Role of central cholinergic neurons in experimental hypertension. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 347-356, 1980.

BUCCAFUSCO, J. J.; MAKARI, N. F.; HAYS, A. C. Pharmacological analysis of the enhanced pressor response to central cholinergic stimulation in spontaneously hypertensive rats. **Japanese journal of pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 105-112, 1990.

CAMPOS, H. O. et al. Temperature Control of Hypertensive Rats during Moderate Exercise in Warm Environment. **Journal of sports science & medicine**, v. 13, n. 3, p. 695, 2014.

CERUTTI, C.; BARRES, C.; PAULTRE, C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. **Am J Physiol**, v. 266, n. 5 Pt 2, p. H1993-2000, May 1994.

COLLINS, H. L. et al. Carotid baroreflex pressor responses at rest and during exercise: cardiac output vs. regional vasoconstriction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 2, p. H642-8, Feb 2001.

CONRAD, C. H. et al. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation**, v. 91, n. 1, p. 161-70, Jan 1995.

CONRAD, C. H. et al. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. **Am J Physiol**, v. 260, n. 1 Pt 2, p. H136-45, Jan 1991.

DAMASCENO, W. C. et al. The dynamics of physical exercise-induced increases in thalamic and abdominal temperatures are modified by central cholinergic stimulation. **Neurosci Lett**, v. 590, p. 193-8, Mar 2015.

DE CASTRO, B. M. et al. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 19, p. 5238-50, Oct 2009.

DWORKIN, B. R.; DWORKIN, S.; TANG, X. Carotid and aortic baroreflexes of the rat: I. Open-loop steady-state properties and blood pressure variability. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 5, p. R1910-21, Nov 2000.

FEHLNER, K. S.; GORDON, C. J. Effect of ambient temperature on thermoregulation in rats following preoptic/anterior hypothalamic injection of physostigmine. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 10, p. 993-7, Oct 1985.

FLORAS, J. S. et al. Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. **J Hypertens**, v. 6, n. 7, p. 525-35, Jul 1988.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol Rev**, v. 62, n. 2, p. 347-504, Apr 1982.

FONSECA, S. F. et al. Hypertension is associated with greater heat exchange during exercise recovery in a hot environment. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 12, p. 1122-9, Dec 2015.

FRIBERG, P.; KARLSSON, B.; NORDLANDER, M. Sympathetic and parasympathetic influence on blood pressure and heart rate variability in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens Suppl**, v. 6, n. 4, p. S58-60, Dec 1988.

GATTU, M. et al. Increased expression of M2 muscarinic receptor mRNA and binding sites in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Brain research**, v. 756, n. 1, p. 125-132, 1997.

GISOLFI, C. V. Is the GI System Built For Exercise? **News Physiol Sci**, v. 15, p. 114-119, Jun 2000.

GISOLFI, C. V. et al. Effects of apomorphine and pimozide on temperature regulation during exercise in the rat. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 49, n. 3, p. 363-6, Sep 1980.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Low-frequency power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baroreflexes. **Exp Physiol**, v. 96, n. 12, p. 1255-61, Dec 2011.

GOMES, W. F. et al. Effect of aerobic training on plasma cytokines and soluble receptors in elderly women with knee osteoarthritis, in response to acute exercise. **Clin Rheumatol**, v. 31, n. 5, p. 759-66, May 2012.

GOMES, W. F. et al. Effect of exercise on the plasma BDNF levels in elderly women with knee osteoarthritis. **Rheumatol Int**, v. 34, n. 6, p. 841-6, Jun 2014.

GONZALEZ-ALONSO, J.; CRANDALL, C. G.; JOHNSON, J. M. The cardiovascular challenge of exercising in the heat. **J Physiol**, v. 586, n. 1, p. 45-53, Jan 1 2008.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav**, v. 47, n. 5, p. 963-91, May 1990.

GOTOH, M.; SMYTHE, G. A. Effects of intracerebroventricularly administered neostigmine on hypothalamic monoaminergic neuronal activities in awake rats. **Brain Res**, v. 586, n. 2, p. 340-3, Jul 24 1992.

GRAYSON, J. Cold and warmth vasoconstrictor responses in the skin of man. **Br Heart J**, v. 13, n. 2, p. 167-72, Apr 1951.

HARTLEY, L. H. et al. Multiple hormonal responses to graded exercise in relation to physical training. **J Appl Physiol**, v. 33, n. 5, p. 602-6, Nov 1972.

HASEGAWA, H. et al. Alteration in dopamine metabolism in the thermoregulatory center of exercising rats. **Neurosci Lett**, v. 289, n. 3, p. 161-4, Aug 11 2000.

HOFFMAN, W. E.; SCHMID, P. G.; PHILLIPS, M. Central cholinergic and noradrenergic stimulation in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 206, n. 3, p. 644-651, 1978.

HOM, S. et al. Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 5, p. R1881-R1892, 2007.

HRABOVSKA, A.; KREJCI, E. Reassessment of the role of the central cholinergic system. **J Mol Neurosci**, v. 53, n. 3, p. 352-8, Jul 2014.

HUIKURI, H. V. et al. Heart rate variability in systemic hypertension. **Am J Cardiol**, v. 77, n. 12, p. 1073-7, May 15 1996.

IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 9, p. 1213-20, Sep 1998.

IUPS. Glossary of terms for thermal physiology: third edition. **Jpn J Physiol**, 51:ixxxvi, 2001.

JOHNSON, C. D.; GILBEY, M. P. Effects of aortic nerve stimulation on discharges of sympathetic neurons innervating rat tail artery and vein. **Am J Physiol**, v. 275, n. 4 Pt 2, p. R942-9, Oct 1998.

JUDY, W. V. et al. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, v. 38, n. 6 Suppl 2, p. 21-9, Jun 1976.

JULIEN, C. et al. Dynamic interactions between arterial pressure and sympathetic nerve activity: role of arterial baroreceptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 4, p. R834-41, Oct 2003.

KAI, H. et al. Large blood pressure variability and hypertensive cardiac remodeling--role of cardiac inflammation. **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 73, n. 12, p. 2198-2203, 2009.

KELLOGG, D. L., JR. et al. Thermoregulatory reflexes and cutaneous active vasodilation during heat stress in hypertensive humans. **J Appl Physiol (1985)**, v. 85, n. 1, p. 175-80, Jul 1998.

KERR, S. et al. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. **Hypertension**, v. 33, n. 6, p. 1353-8, Jun 1999.

KOGA, S. et al. Dynamic heterogeneity of exercising muscle blood flow and O₂ utilization. **Med Sci Sports Exerc**, v. 46, n. 5, p. 860-76, 2014.

KOMATSU, K. et al. Glomerular dynamics and morphology of aged spontaneously hypertensive rats. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. **Hypertension**, v. 25, n. 2, p. 207-13, Feb 1995.

KUBO, T.; TATSUMI, M. Increased pressor responses to physostigmine in spontaneously hypertensive rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 306, n. 1, p. 81-3, Jan 1979.

KUBO, T. et al. Enhanced release of acetylcholine in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Brain research**, v. 686, n. 1, p. 1-9, 1995.

LACERDA, A. C. et al. Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats. **Neurosci Lett**, v. 393, n. 2-3, p. 260-3, Jan 30 2006.

LACERDA, A. C.; MARUBAYASHI, U.; COIMBRA, C. C. Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. **Brain Res Bull**, v. 67, n. 1-2, p. 110- 6, Sep 30 2005.

LACERDA, A. C. R. **Papel do óxido nítrico central na termorregulação durante o exercício físico em rato**. 2006. 78f. Tese (Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte, 2006.

LANGEWITZ, W.; RUDDER, H.; SCHACHINGER, H. Reduced parasympathetic cardiac control in patients with hypertension at rest and under mental stress. **Am Heart J**, v. 127, n. 1, p. 122-8, Jan 1994.

LAZARTIGUES, E. et al. Spontaneously hypertensive rats cholinergic hyper-responsiveness: central and peripheral pharmacological mechanisms. **British journal of pharmacology**, v. 127, n. 7, p. 1657-1665, 1999.

LEITE, L. H. et al. Contribution of the paraventricular nucleus in autonomic adjustments to heat stress. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 5, p. 570-577, 2012.

LIAO, D. et al. Association of cardiac autonomic function and the development of hypertension: the ARIC study. **Am J Hypertens**, v. 9, n. 12 Pt 1, p. 1147-56, Dec 1996.

LIN, M. T.; WANG, H. C.; CHANDRA, A. The effects on thermoregulation of intracerebroventricular injections of acetylcholine, pilocarpine, physostigmine, atropine and hemicholinium in the rat. **Neuropharmacology**, v. 19, n. 6, p. 561-5, Jun 1980.

MAKARI, N. F.; TRIMARCHI, G. R.; BUCCAFUSCO, J. J. Contribution of pre- and post- synaptic components to heightened central cholinergic activity in spontaneously hypertensive rats. **Neuropharmacology**, v. 28, n. 4, p. 379-86, Apr 1989.

MANCIA, G. et al. Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. **Circ Res**, v. 53, n. 1, p. 96-104, Jul 1983.

MATTHEW, C. B.; FRANCESCONI, R. P.; HUBBARD, R. W. Physostigmine: dose-response effects on endurance and thermoregulation during exercise. **Life Sci**, v. 50, n. 1, p. 39-44, 1992.

MCALLISTER, R. M.; HIRAI, T.; MUSCH, T. I. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 8, p. 1145-51, Aug 1995.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.L.; KATCH, V.L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. In: **Exercício e estresse térmico**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 25, p. 640-666.

MELO, D. S. et al. Severe Calorie Restriction Reduces Cardiometabolic Risk Factors and Protects Rat Hearts from Ischemia/Reperfusion Injury. **Front Physiol**, v. 7, p. 106, 2016.

MICHELINI, L. C. et al. Neural control of circulation and exercise: a translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 3, p. H381-92, Aug 1 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Hipertensão atinge 24,3% da população adulta**. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/hipertensao-atinge-24-3-da-populacao-adulta> > Acesso em: 27 set. 2016.

MYERS, R. D.; YAKSH, T. L. Control of body temperature in the unanaesthetized monkey by cholinergic and aminergic systems in the hypothalamus. **J Physiol**, v. 202, n. 2, p. 483- 500, Jun 1969.

NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Auton Neurosci**, v. 85, n. 1-3, p. 18-25, Dec 20 2000.

O'LEARY, D. S.; JOHNSON, J. M. Baroreflex control of the rat tail circulation in normothermia and hyperthermia. **J Appl Physiol (1985)**, v. 66, n. 3, p. 1234-41, Mar 1989.

O'LEARY, D.; WANG, G. Impaired thermoregulatory cutaneous vasodilation in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 2, p. 692-696, 1994. ISSN 8750-7587.

O'LEARY, D. S.; JOHNSON, J. M.; TAYLOR, W. F. Mode of neural control mediating rat tail vasodilation during heating. **J Appl Physiol** (1985), v. 59, n. 5, p. 1533-8, Nov 1985.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, n. 3, p. 282-293, 1963.

OOTSUKA, Y.; TANAKA, M. Control of cutaneous blood flow by central nervous system. **Temperature (Austin)**, v. 2, n. 3, p. 392-405, Jul-Sep 2015.

OWENS, N. C. et al. Thermoregulatory control of sympathetic fibres supplying the rat's tail. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 3, p. 849-58, Sep 15 2002.

PAXINOS G; WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6. Elsevier Science & Technology Books, 2007.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular research**, v. 39, n. 1, p. 77-88, 1998.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 1, p. 77-88, Jul 1998.

PIRES, W. et al. Intracerebroventricular physostigmine enhances blood pressure and heat loss in running rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 58, n. 1, p. 3-17, Mar 2007.

PIRES, W. et al. Physical exercise performance in temperate and warm environments is decreased by an impaired arterial baroreflex. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72005, 2013.

PIRES, W. et al. Sinoaortic denervation prevents enhanced heat loss induced by central cholinergic stimulation during physical exercise. **Brain Res**, v. 1366, p. 120-8, Dec 17 2010.

PIRES, W. **O desempenho físico em ambientes temperado e quente é diminuído pela ausência das aferências provenientes dos barorreceptores arteriais**. 2012. 77f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte) - Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas gerais, Belo Horizonte, 2012.

PRADO, M. A. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem Int**, v. 41, n. 5, p. 291-9, Nov 2002.

PRADO, V. F. et al. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 601-12, Sep 7 2006.

PRIMOLA-GOMES, T. N. et al. Activation of the central cholinergic pathway increases post-exercise tail heat loss in rats. **Neurosci Lett**, v. 413, n. 1, p. 1-5, Feb 8 2007.

RADAELLI, A. et al. Adrenergic origin of very low-frequency blood pressure oscillations in the unanesthetized rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 1, p. H357-64, Jan 2006.

RATHNER, J. A.; MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F. Central pathway for spontaneous and prostaglandin E2-evoked cutaneous vasoconstriction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 1, p. R343-54, Jul 2008.

RIBEIRO, F. M. et al. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. **J Neurochem**, v. 97, n. 1, p. 1-12, Apr 2006.

RIBEIRO, G. A. et al. Thermoregulation in hypertensive men exercising in the heat with water ingestion. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 409-17, Mar 2004.

RODRIGUES, A. et al. Evidence that exercise-induced heat storage is dependent on adrenomedullary secretion. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 3, p. 463-467, 2008.

RODRIGUES, A. G. et al. Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 97, n. 1, p. 333-8, Jul 2004.

RODRIGUES, A. G. et al. Heat loss during exercise is related to serotonin activity in the preoptic area. **Neuroreport**, v. 20, n. 8, p. 804-8, May 27 2009.

ROMANOVSKY, A. A. et al. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. **Pharmacol Rev**, v. 61, n. 3, p. 228-61, Sep 2009.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **J Appl Physiol** (1985), v. 92, n. 6, p. 2667-79, Jun 2002.

SCHWIMMER, H.; GERSTBERGER, R.; HOROWITZ, M. Nitric oxide and angiotensin II: neuromodulation of thermoregulation during combined heat and hypohydration stress. **Brain Res**, v. 1006, n. 2, p. 177-89, May 2004.

SHELLOCK, F. G.; RUBIN, S. A. Temperature regulation during treadmill exercise in the rat. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 57, p. 1872-1877, 1984. ISSN 0161-7567.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, v. 5, n. 3, p. 293-302, Jun 2005.

SIMAO, A. P. et al. Functional performance and inflammatory cytokines after squat exercises and whole-body vibration in elderly individuals with knee osteoarthritis. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 93, n. 10, p. 1692-700, Oct 2012.

SINGH, J. P. et al. Reduced heart rate variability and new-onset hypertension: insights into pathogenesis of hypertension: the Framingham Heart Study. **Hypertension**, v. 32, n. 2, p. 293-7, Aug 1998.

SOARES, D. et al. Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 2, p. 255-261, 2004.

SOARES, P. P. et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. **Auton Neurosci**, v. 113, n. 1-2, p. 24-31, Jun 30 2004.

TAKAHASHI, A. et al. Hypothalamic cholinergic activity and 2-deoxyglucose-induced hyperglycemia. **Brain Res Bull**, v. 43, n. 1, p. 65-8, 1997.

TANAKA, H.; YASUMATSU, M.; HASEGAWA, H. Changes in selected ambient temperatures following physical training in rats. **Jpn J Physiol**, v. 53, n. 4, p. 309-12, Aug 2003.

TANG, X.; DWORKIN, B. R. The dmNTS is not the source of increased blood pressure variability in baroreflex denervated rats. **Auton Neurosci**, v. 148, n. 1-2, p. 21-7, Jun 15 2009.

TOSSIGE-GOMES, R. et al. Whole-body vibration decreases the proliferative response of TCD4(+) cells in elderly individuals with knee osteoarthritis. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 12, p. 1262-8, Dec 2012.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 339-52, Oct 2004.

TRIGGLE, D. J.; MITCHELL, J. M.; FILLER, R. The Pharmacology of Physostigmine. **CNS Drug Reviews**, v. 4, n. 2, p. 87-136, 1998.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res**, v. 48, n. 3, p. 309-19, Mar 1981.

VIRTANEN, R. et al. Reduced heart rate variability in hypertension: associations with lifestyle factors and plasma renin activity. **J Hum Hypertens**, v. 17, n. 3, p. 171-9, Mar 2003.

WAKI, H. et al. Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. **Exp Physiol**, v. 91, n. 1, p. 201-13, Jan 2006.

WANNER, S. P. et al. Muscarinic cholinceptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. **Brain research bulletin**, v. 73, n. 1, p. 28-33, 2007.

WANNER, S. P. et al. Increased brain L-arginine availability facilitates cutaneous heat loss induced by running exercise. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 42, n. 6, p. 609-16, Jun 2015.

WEBB, P. The physiology of heat regulation. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 37, n. 4, p. R838, 1995.

WILSON, N. C. et al. Colonic and tail-skin temperature responses of the rat at selected running speeds. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 44, n. 4, p. 571-5, Apr 1978.

WOLF-MAIER, K. et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. **JAMA**, v. 289, n. 18, p. 2363-9, May 14 2003.

YAMAMOTO, R.; CLINE, W. H., JR. Release of endogenous NE from the mesenteric vasculature of WKY and SHR in response to PNS. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 241, n. 3, p. 826-32, Jun 1987.

YOSHIMOTO, T. et al. Frequency components of systolic blood pressure variability reflect vasomotor and cardiac sympathetic functions in conscious rats. **J Physiol Sci**, v. 61, n. 5, p. 373-83, Sep 2011.

YOUNG, A.; DAWSON, N. Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 392-398, 1982.

ZHANG, D. et al. Carotid-sinus baroreflex modulation of core and skin temperatures in rats: an open-loop approach. **Jpn J Physiol**, v. 53, n. 6, p. 461-6, Dec 2003.

ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Diamantina, 28 de março de 2015.

A proposta referente ao

Protocolo nº:

039/2014

Intitulado:

“Parâmetros termorregulatórios, cardiovasculares e inflamatórios durante e após exercício físico em ambiente quente em ratos espontaneamente hipertensos.”

Pesquisador (a) responsável:

Prof. Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda

Universidade/Faculdade/Departamento

UFVJM / FCBS/ FISIOTERAPIA

Foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM em 18 de março de 2015.

Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.


Cleube Andrade Boari

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM

Campus JK

Comissão de Ética no Uso de Animais/ UFVJM
Prédio da Reitoria-PRPPG- Rodovia MGT 367
- Km 583, nº 5000nAlto da Jacuba - Diamantina/MG –
CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200

CEUA Comissão de Ética
no Uso de Animais